

**PENGARUH PEMBERIAN BUBUK EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo Sp.*)
TERHADAP DAYA HAMBAT DAN *BIOFILM COVERAGE RATE* (BCR) PADA
BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh:

**MUHAMMAD RIFKI KHUSNUDHONI
NIM. 145080500111004**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

**PENGARUH PEMBERIAN BUBUK EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo Sp.*)
TERHADAP DAYA HAMBAT DAN *BIOFILM COVERAGE RATE* (BCR) PADA
BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh:

**MUHAMMAD RIFKI KHUSNUDHONI
NIM. 145080500111004**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN BUBUK EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo Sp.*)
TERHADAP DAYA HAMBAT DAN *BIOFILM COVERAGE RATE* (BCR) PADA
BAKTERI *Vibrio parahaemolyticus* SECARA IN VITRO**

Oleh:

MUHAMMAD RIFKI KHUSNUDHONI
NIM. 145080500111004

Mengetahui,
Menyetujui,
Ketua Jurusan MSP



Dr. Ir. M. Firdaus, MP
NIP. 19680919 200501 1 001
TANGGAL: 18 JUL 2018

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc
NIP. 19621014 198701 1 001
TANGGAL: 18 JUL 2018

LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI

JUDUL : PENGARUH PEMBERIAN BUBUK EKSTRAK TINTA
CUMI-CUMI (*Loligo* sp.) TERHADAP DAYA HAMBAT DAN
BIOFILM COVERAGE RATE (BCR) PADA BAKTERI *Vibrio*
parahaemolyticus SECARA *IN VITRO*

Nama Mahasiswa : MUHAMMAD RIFKI KHUSNUDHONI

NIM : 145080500111004

Program Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING:

Pembimbing : Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:

Dosen Penguji 1 : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS

Dosen Penguji 2 : Ir. Heni Suprastyani, MS

Tanggal Ujian : Jumat, 5 Juli 2018

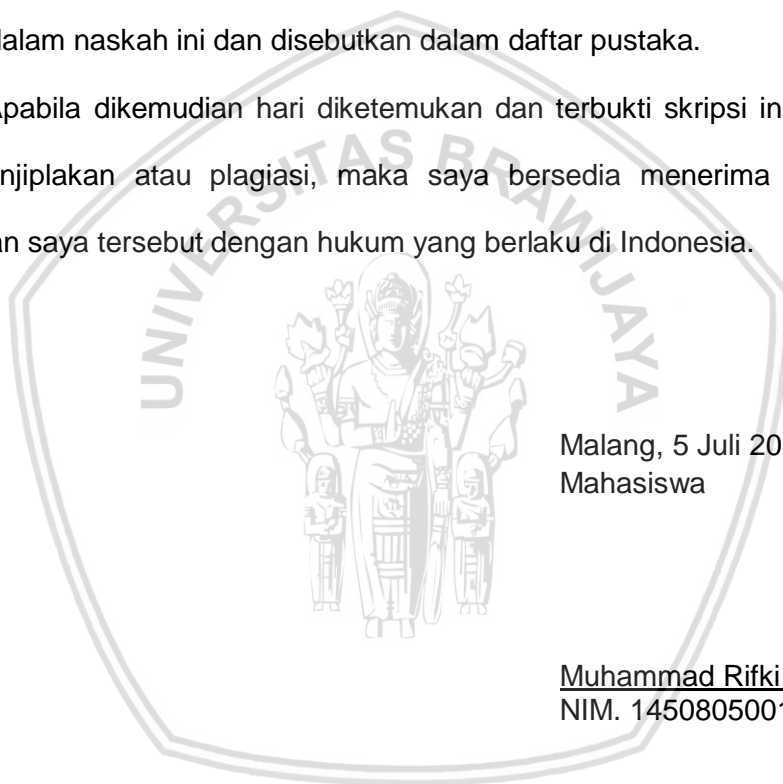
PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.) terhadap Daya Hambat dan *Biofilm Coverage Rate* (BCR) Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* Secara *In Vitro*” merupakan hasil karya saya sendiri dibawah payung penelitian Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M. Sc. Sepanjang pengetahuan saya, tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari diketemukan dan terbukti skripsi ini merupakan hasil penjiplakan atau plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan saya tersebut dengan hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 5 Juli 2018
Mahasiswa

Muhammad Rifki K
NIM. 145080500111004



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas rahmat, taufik dan hidayah-Nya, penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi. Kesempatan yang baik ini, perkenankan penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- Kedua orang tua yang selalu memberikann doa, dukungan dan nasehat kepada penulis.
- Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan saran, bimbingan, arahan dan nasehat kepada penulis sehingga laporan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
- Titin Yuniastutik, S.TP selaku laboran Laboratorium Budidaya Ikan divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan yang telah menyediakan tempat untuk penelitian dan juga memberikan saran, arahan dan masukan sehingga penulis dapat melaksanakan penelitian dengan baik.
- Jefri Anjaini S.Pi, Endar Riani S.Pi, Riyan Apriyanto S.Pi, Siska Dwi Satya Mariani, Eryana Zulfia Siregar, Diani Kusumaningrum, Niko Alvian Akbar, Donny Damara Deristya, Bramudya Dwi Putra, Rangga Idris Affandi dan Muhammad Rifqi Adilah yang telah banyak membantu penulis dalam melaksanakan penelitian dan penulisan laporan.
- Teman-teman Budidaya Peraira angkatan 2014 sebagai sahabat dan keluarga bagi penulis

RINGKASAN

MUHAMMAD RIFKI KHUSNUDHONI. Pengaruh Pemberian Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) terhadap Daya Hambat dan *Biofilm Coverage Rate* (BCR) Bakteri *Vibrio parahaemolyticus* Secara *In Vitro*. Dibawah payung penelitian **Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc.**

Udang vanname saat ini banyak dibudidayakan karena memiliki beberapa keunggulan, antara lain yaitu dapat tumbuh secepat udang windu (3 gram/minggu), dapat dibudidayakan pada kisaran salinitas yang lebar (0,5-45 ppt), kebutuhan protein yang lebih rendah (20-35%), konversi pakan lebih rendah (1,2-1,6), serta dapat ditebar dengan kepadatan tinggi hingga mencapai lebih dari 150 ekor/m². Terjadi penurunan jumlah ekspor udang pada kurun waktu tahun 2009-2010 sebesar 2,69%, yaitu dari 117.093 ton menjadi 113.937 ton. Turunnya jumlah permintaan udang Indonesia juga disebabkan oleh banyaknya penolakan udang yang akan di ekspor ke pasar dunia. Hal ini berdampak pada kerugian materil yang cukup besar bagi industri pengolahan udang dan para pengusaha petambak udang vanname. Salah satu penyebab penolakan ekspor udang adalah adanya kontaminasi mikroba patogen yaitu *Vibrio parahaemolyticus*.

Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimen dengan menggunakan rancangan percobaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 perlakuan, 3 kali ulangan. Bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) yang digunakan yaitu A (150 ppm), B (200 ppm), dan C (250 ppm), sedangkan K+ (*Oxytetracyclin* 5 ppm) dan K- (tanpa penambahan ekstrak). Parameter utama yang diuji adalah daya hambat dan *Biofilm Coverage Rate* (BCR) pada bakteri *V. parahaemolyticus*. Data diolah menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA).

Hasil penelitian didapatkan rata-rata dari daya hambat bakteri *V. parahaemolyticus* yaitu perlakuan A (150 ppm) sebesar 8,91 mm, perlakuan B (200 ppm) sebesar 9,76 mm, perlakuan C (250 ppm) sebesar 10,29 mm. Pemberian dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. parahaemolyticus*. Hubungan keduanya mendapatkan persamaan linier yaitu $y = 6,886 + 0,014x$ dengan $R^2 = 0,8882$. Hasil rata-rata *Biofilm Coverage Rate* (BCR) bakteri *V. parahaemolyticus* yaitu perlakuan A (150 ppm) sebesar 10,44%, perlakuan B (200 ppm) sebesar 14,60%, perlakuan C (250 ppm) sebesar 18,05%. Pemberian dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) berpengaruh sangat nyata terhadap *biofilm coverage rate* (BCR) pada bakteri *V. harveyi*. Hubungan keduanya mendapatkan persamaan linier yaitu $y = -0,859 + 0,076x$ dengan $R^2 = 0,8793$. Hasil visual 3 dimensi menunjukkan bahwa pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) pada perlakuan A (250 ppm) memiliki tutupan biofilm terendah dibandingkan dengan perlakuan B dan C.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) berpengaruh terhadap daya hambat dan *biofilm coverage rate* (BCR) bakteri *V. parahaemolyticus*. Pada uji daya hambat perlakuan terbaik yaitu pada perlakuan A dengan dosis bubuk ekstrak tinta cumi-cumi sebesar 150 ppm dengan rerata nilai daya hambat 8,91 mm. Pada uji BCR perlakuan terbaik yaitu pada perlakuan C sebesar 9,63% dengan hasil visual 3 dimensi dengan tutupan biofilm yang sedikit.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul “pengaruh pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) terhadap daya hambat dan *biofilm coverage rate* (BCR) pada bakteri *Vibrio parahaemolyticus* secara in vitro”. Penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing dan semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan laporan ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang mendasar pada laporan ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun. Kritik konstruktif dari pembaca sangat diharapkan untuk penyempurnaan laporan selanjutnya, agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, 5 Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
HALAMAN IDENTITAS TIM PENGUJI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan	5
1.4 Hipotesis	5
1.5 Kegunaan Penelitian	6
1.6 Tempat dan Waktu	6
2. TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Bakteri <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	7
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	8
2.1.2 Karakteristik Bakteri	8
2.2 Kandungan Senyawa Aktif Tinta Cumi-Cumi	9
2.3 Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi	10
2.4 Uji Daya Hambat Secara <i>In Vitro</i> dengan Uji Cakram	11
2.5 <i>Biofilm Coverage Rate</i> (BCR)	12
2.5.1 Definisi Biofilm	12
2.5.2 Struktur Biofilm	12
2.5.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm	13
2.5.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm	14
2.6 Antibakteri	16
3. METODE PENELITIAN	18
3.1 Materi Penelitian	18

3.1.1	Peralatan Penelitian	18
3.1.2	Bahan Penelitian	19
3.2	Metode dan Rancangan Penelitian	19
3.2.1	Metode Penelitian	19
3.2.2	Rancangan Penelitian.....	20
3.3	Prosedur Penelitian	22
3.3.1	Pembuatan Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-cumi.....	22
3.3.2	Sterilisasi	23
3.3.3	Pembuatan Media <i>Tryptic Soy Broth</i>	24
3.3.4	Kultur Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	25
3.3.5	Parameter Uji	25
3.4	Pengambilan Data	28
3.5	Analisis Data	31
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	32
4.1	Uji <i>Minimum Inhibiting Concentration</i> (MIC).....	32
4.2	Uji Cakram (Daya Hambat).....	34
4.3	Biofilm Coverage Rate (BCR)	39
4.4	Visual 3 Dimensi (3D)	42
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	46
5.1	Kesimpulan	46
5.2	Saran	46
	DAFTAR PUSTAKA.....	47
	LAMPIRAN.....	50



DAFTAR GAMBAR

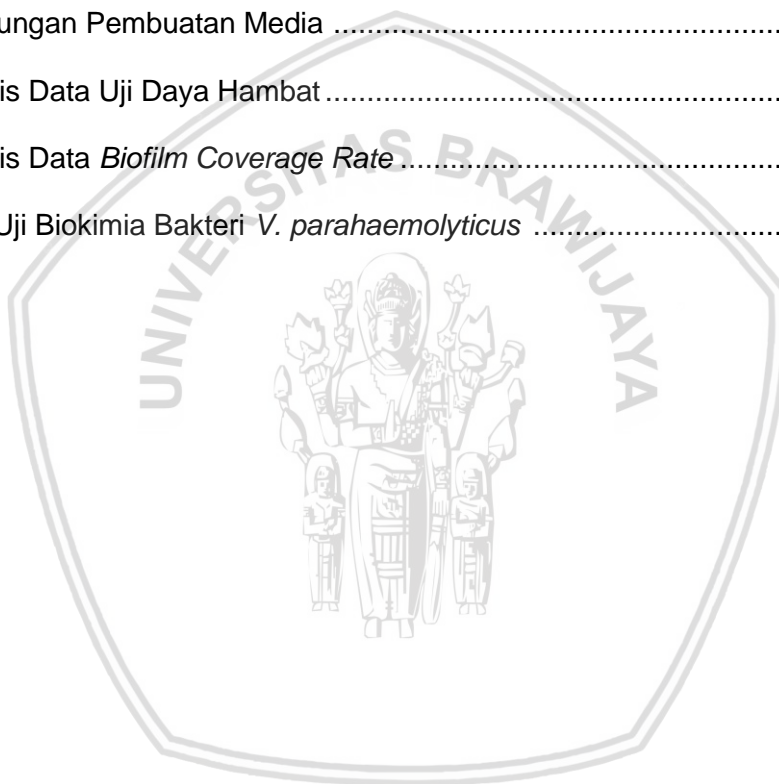
Gambar	halaman
1. Morfologi Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	7
2. Mekanisme Pembentukan Biofilm.....	14
3. Denah Penelitian	21
4. Tampilan Awal <i>Software Image-J</i>	28
5. Langkah Pemilihan Gambar.....	29
6. Merubah Format Gambar menjadi <i>grayscale</i>	29
7. Menampilkan Gambar menjadi <i>Black and White</i>	30
8. Langkah Menampilkan Analisis Nilai BCR	30
9. Kotak Dialog <i>Summary</i>	31
10. Zona Hambat	36
11. Grafik Hubungan Zona Hambat Dosis Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi terhadap Bakteri <i>V. parahemolyticus</i>	38
12. Grafik Hubungan Dosis Ekstrak Tinta Cumi-Cumi dengan BCR Bakteri <i>V.</i> <i>parahaemolyticus</i>	41

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Peralatan Penelitian.....	17
2. Bahan Penelitian.....	18
3. Nilai Uji MIC Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (<i>Loligo sp.</i>) terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	32
4. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat	35
5. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri	35
6. Analisis Sidik Ragam	37
7. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)	37
8. Nilai BCR yang dihasilkan oleh Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i> dengan Pemberian Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (<i>Loligo sp.</i>)	39
9. Analisis Sidik Ragam BCR <i>V. parahaemolyticus</i> dengan Pemberian Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (<i>Loligo sp.</i>)	40
10. Hasil Uji BNT Ragam BCR <i>V. parahaemolyticus</i> dengan Pemberian Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (<i>Loligo sp.</i>)	40
11. Visualisasi BCR Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i> menggunakan <i>Image-J</i>	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Peralatan Penelitian.....	50
2. Bahan Penelitian.....	53
3. Dokumentasi Kegiatan	55
4. Skema Kerja	56
5. Perhitungan Pembuatan Media	64
6. Analisis Data Uji Daya Hambat.....	66
7. Analisis Data <i>Biofilm Coverage Rate</i>	71
8. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	76



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut data dari Direktorat Jenderal Perikanan Budidaya (DJPB), produksi udang nasional pada tahun 2010 meningkat sebanyak 12,69% dibandingkan dengan produksi tahun 2009, yaitu dari 338.060 ton menjadi 380.972 ton. Peningkatan jumlah produksi udang tersebut selayaknya harus diimbangi oleh besarnya jumlah permintaan. Namun fakta dilapangan jumlah produksi tidak diimbangi dengan kenaikan permintaan pasar, khususnya pasar ekspor. Menurut data dari Badan Pusat Statistik (2017), terjadi penurunan jumlah ekspor udang pada kurun waktu tahun 2009-2010 sebesar 2,69%, yaitu dari 117.093 ton menjadi 113.937 ton. Potensi budidaya udang vaname di Indonesia sangat terbuka untuk dikembangkan karena memiliki produktivitas yang tinggi. Menurut Supono (2006), produktivitas udang vaname mencapai 13.600 kg/ha dengan tingkat kelulushidupan yaitu 91%. Selain itu, produktivitas udang vaname ditunjang dari padat penebaran yang tinggi mencapai 60–150 ekor/m² dengan tingkat pertumbuhan 1–1,5 gr/minggu. Udang vaname (*Litopenaeus vaname*) merupakan udang alternatif selain udang windu (*Penaeus monodon*) yang dapat dibudidayakan secara intensif. Udang vaname memiliki keunggulan yaitu dapat tumbuh secepat udang windu (3 gram/minggu), dapat dibudidayakan pada kisaran salinitas yang lebar (0,5-45 ppt), kebutuhan protein yang lebih rendah (20-35%), konversi pakan lebih rendah (1,2-1,6), serta dapat ditebar dengan kepadatan tinggi hingga mencapai lebih dari 150 ekor/m² (Budiarti *et al.*, 2005).

Perkembangan sistem budidaya udang vannamei dari tambak tradisional ke tambak intensif memiliki potensi terhadap peningkatan pencemaran lingkungan. Kurang optimalnya pemberian dan pemanfaatan pakan oleh udang akan menyebabkan penumpukan bahan organik. Penguraian bahan organik

memerlukan asupan oksigen dalam prosesnya, sehingga ketersediaan oksigen bagi biota didalamnya menjadi berkurang. Apabila hal ini terjadi secara berkelanjutan dan terus menerus, maka akan menyebabkan kematian bagi udang dan biota lainnya. Faktor diatas merupakan penyebab menurunnya ketahanan tubuh organisme terhadap serangan penyakit karena kualitas lingkungan yang buruk. Peristiwa tersebut juga akan menjadikan populasi udang akan menurun (Kilawati dan Maimunah, 2015).

Turunnya jumlah permintaan udang Indonesia juga disebabkan oleh banyaknya penolakan udang yang akan di ekspor ke pasar dunia. Hal ini berdampak pada kerugian materil yang cukup besar bagi industri pengolahan udang dan para pengusaha petambak udang vannamei. Salah satu penyebab penolakan ekspor udang adalah adanya kontaminasi mikroba patogen yaitu *Vibrio parahaemolyticus*. *V. parahaemolyticus* merupakan flora normal di lingkungan perairan payau dan salah satu spesies *Vibrio spp.* yang bersifat patogen terhadap komoditas udang. Keberadaan *V. parahaemolyticus* pada produk perikanan dapat menyebabkan kerugian pada para pelaku usaha. Bakteri ini juga merupakan sebuah ancaman bagi kesehatan biota yang terserang. Jenis bakteri ini dilaporkan di lapangan merupakan jenis bakteri yang ganas. Komoditas yang sedang dibudidayakan bisa mati dalam waktu yang sangat singkat (Yennie *et al.*, 2015).

Penyakit vibriosis pada udang sering menyebabkan mortalitas massal dan kegagalan panen pada tambak udang di Indonesia dan negara penghasil udang lainnya. Penyakit vibriosis yang sering menyerang udang pada stadia larva, pasca larva dan udang muda disebabkan oleh beberapa spesies bakteri *Vibrio* antara lain: *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. vulnificus* dan *V. fluvialis*. Bakteri *V. parahaemolyticus* adalah bakteri gram negatif yang dikenal sebagai penyakit yang sangat akut dan ganas. Bakteri *V. parahaemolyticus* merupakan bakteri laut asli yang dapat diisolasi dari biota laut, rumput laut, air laut

dan air payau. Penerapan teknologi dalam upaya penanggulangan penyakit *bacterial* telah banyak dilakukan, mulai dari pencegahan sampai tindakan pengobatan dengan menggunakan berbagai antibiotik. Kebiasaan menggunakan antibiotik ini menimbulkan dampak negatif, tidak hanya mengakibatkan bakteri pathogen menjadi resisten, tetapi juga berdampak buruk terhadap lingkungan dan masyarakat sekitar (Muliani *et al.*, 2016). Penggunaan antibiotik *oxytetracyclin* dalam usaha pembesaran udang vannamei telah banyak digunakan oleh para pengusaha. Pemilihan antibiotik *oxytetracyclin* karena jenis antibiotik ini mudah didapatkan dan mudah dalam penggunaan. Pada bakteri *V. parahaemolyticus* melalui uji biokimia didapatkan hasil bahwa bakteri ini resisten terhadap zat *ampicylin*. Berdasarkan hasil uji biokimia tersebut, penggunaan antibiotik *oxytetracyclin* karena bakteri *V. parahaemolyticus* belum resisten terhadap antibiotik *oxytetracyclin*. Berdasarkan beberapa penelitian yang pernah dilakukan, diketahui bahwa tinta yang dihasilkan oleh moluska memiliki beberapa kandungan diantaranya adalah antibakteri, antitumor dan antivirus (Mohanraju *et al.*, 2013).

Tinta yang dihasilkan oleh moluska mengandung bahan kimia yang disekresikan untuk melarikan diri dari predator. Salah satu kandungan bahan kimia tersebut adalah antibakteri yang dihasilkan dari ekstrak insang dan kantong tinta pada moluska. Ekstrak kasar tinta *Loligo duvauceli* diketahui mempunyai aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap *Staphylococcus aureus*, sedangkan ekstrak kasar tinta *Sepia pharaonis* mempunyai aktivitas antibakteri yang tinggi terhadap *V. fischeri* dan *Aeromonas hydrophila*. Ekstrak kasar tinta yang dihasilkan oleh kedua hewan tersebut mampu menghasilkan zona hambat maksimum yang menunjukkan bahwa keduanya sangat potensial digunakan sebagai agen antimikroba, sehingga dapat digunakan sebagai pengganti antibiotik dengan harga yang lebih terjangkau (Diaz dan Thilaga, 2016).

Kemampuan bakteri untuk memendarkan cahaya erat kaitannya dengan kemampuan *quorum sensing* dari bakteri itu sendiri. *Quorum sensing* akan berlangsung secara maksimal apabila terjadi didalam biofilm. Hal tersebut diakibatkan oleh adanya lapisan *extracellular polymer substance* (EPS) yang dihasilkan oleh bakteri pada pembentukan biofilm. Menurut Nadel *et al.* (2008), pada pembentukan biofilm, bakteri akan mensekresikan EPS, yaitu ikatan polimer yang sebagian besar terdiri dari polisakarida serta sebagian kecil protein dan DNA. Sekresi EPS ini dapat melindungi bakteri dari lingkungan luar, sehingga *quorum sensing* dapat berlangsung secara maksimal. Sekresi EPS terjadi dibawah kontrol *quorum sensing* dan hanya akan terbentuk jika kepadatan bakteri telah mencapai ambang batas tertentu.

Berdasarkan uraian yang menyebutkan bahwa tinta cumi-cumi mampu menghasilkan antibakteri yang dapat menghambat aktivitas bakteri, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kemampuan bubuk ekstrak tinta cumi-cumi dalam mempengaruhi daya hambat dan *biofil coverage rate* (BCR) pada bakteri *V. parahaemolyticus*.

1.2 Perumusan Masalah

V. parahaemolyticus merupakan bakteri yang menyerang udang di pembesaran maupun pembenihan. Penyakit vibriosis yang akut dapat mematikan udang dalam tempo yang sangat cepat. Udang yang terserang penyakit ini sangat sulit untuk diselamatkan. Satu-satunya solusi adalah mengambil udang yang sakit tersebut agar tidak menularkan penyakitnya ke udang yang lain.

Selama ini pengendalian penyakit vibriosis masih pada penggunaan antibiotik. Penggunaan antibiotik tersebut tentu dapat menyebabkan dampak yang sangat merugikan. Karena pengendalian dengan menggunakan antibiotik secara terus-menerus dapat menyebabkan udang tersebut resisten terhadap penyakit

tersebut. Kemudian penggunaan antibiotik pada udang juga membahayakan manusia yang mengkonsumsinya.

Ekstraksi tinta sotong dalam konsentrasi rendah dapat digunakan sebagai antibakteri (Girija *et al.*, 2012). Bubuk ekstrak tinta cumi-cumi mempunyai sifat antibakteri, baik bakteri gram positif ataupun bakteri gram negatif. Selain itu, penentuan dosis yang tepat juga perlu diperhatikan karena dengan dosis yang tepat, pertumbuhan bakteri dapat dicegah ataupun dimatikan. Berkaitan dengan hal tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- Apakah ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) mampu mempengaruhi daya hambat dan *Biofilm Coverage Rate* (BCR) pada bakteri *V. parahaemolyticus* secara in vitro.
- Berapakah dosis optimal ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) agar mampu mempengaruhi daya hambat dan *Biofilm Coverage Rate* (BCR) pada bakteri *V. parahaemolyticus*.

1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, tujuan dari penelitian ini yaitu:

- Mengetahui pengaruh pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi pada dosis tertentu terhadap daya hambat dan *biofilm coverage rate* (BCR) pada bakteri *V. parahaemolyticus* secara in vitro.
- Mengetahui dosis optimal ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) agar mampu mempengaruhi daya hambat dan *Biofilm Coverage Rate* (BCR) pada bakteri *V. parahaemolyticus*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini yaitu:

H₀ : diduga penggunaan bubuk ekstrak tinta cumi-cumi tidak berpengaruh terhadap daya hambat dan *biofilm coverage rate* (BCR) pada bakteri *V.*

parahaemolyticus secara in vitro

H1 : diduga penggunaan bubuk ekstrak tinta cumi-cumi berpengaruh terhadap daya hambat dan *biofilm coverage rate* (BCR) pada bakteri *V.*

parahaemolyticus secara in vitro

1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan penelitian ini adalah untuk memberikan informasi kepada masyarakat mengenai pemanfaatan tinta cumi cumi yang sudah dalam bentuk bubuk ekstrak tinta cumi-cumi untuk mencegah munculnya bakteri *V. parahaemolyticus*, sehingga dengan demikian diharapkan mampu digunakan untuk menggantikan penggunaan antibiotik yang dapat menimbulkan resisten dan mengakibatkan residu.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Penyakit dan Kesehatan Ikan dan Divisi Reproduksi Ikan dan Laboratorium UPT Perikanan Air Tawar Sumber Pasir, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Januari sampai dengan bulan Maret 2018.

2. TINJAUAN PUSTAKA

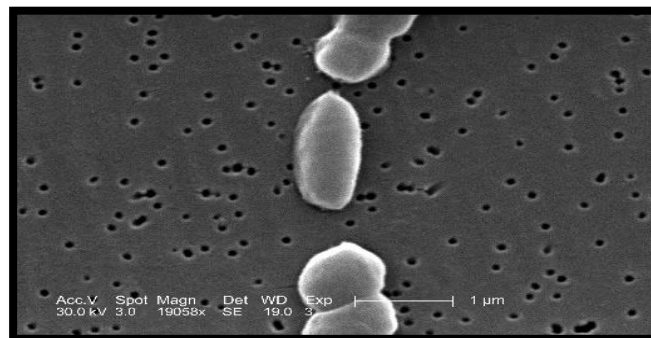
2.1 Biologi bakteri *V. parahaemolyticus*

2.1.1 Klasifikasi dan morfologi bakteri *V. parahaemolyticus*

Menurut Sakazaki *et al.* (1963), klasifikasi bakteri *V. parahaemolyticus* adalah sebagai berikut:

Filum : Proteobacteria
Kelas : Gammaproteobacteria
Ordo : Vibrionales
Famili : Vibrionaceae
Genus : Vibrio
Spesies : *V. parahaemolyticus*

Dilihat dengan mikroskop, *V. parahaemolyticus* nampak lurus, kadang kala bentuknya juga melengkung dengan ujung bulat, pleomorfik, dan biasanya bentuk sel tunggal namun sesekali dalam bentuk rantai. Cabassi dan Mod (1976) *V. parahaemolyticus* adalah gram-negatif dan merupakan konsentrasi pewarnaan gram. Selain itu bakteri *V. parahaemolyticus* memiliki flagelum tunggal, polar dan bersarung saat tumbuh dalam cairan medium. Kimura *et al.* (1979) melaporkan bahwa pembentukan peritrichous, tapi tidak polar flagella, dihambat di media pH 8,5 dan lebih tinggi dari 8,5 (Joseph *et al.*, 2013). Morfologi bakteri *V. parahaemolyticus* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Morfologi bakteri *V. parahemolyticus* (Sakazaki *et al.*, 1963).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

V. parahaemolyticus adalah bakteri halofilik gram negatif, bakteri ini muncul secara musiman. Biasanya, pada musim panas *V. parahaemolyticus* relatif mudah dideteksi pada air laut, sedimen, plankton, ikan, krustasea dan moluska yang merupakan tempat hidupnya di ekosistem. Mereka terkonsentrasi dalam saluran pencernaan moluska, seperti kerang, tiram dan mussel yang mendapatkan makanannya dengan cara mengambil dan menyaring air laut (Charles-Hernández *et al.*, 2006).

V. parahaemolyticus dapat diisolasi di seluruh lingkungan muara. Mulai dari air, sedimen, partikel tersuspensi, plankton, ikan, dan kerang telah ditunjukkan untuk isolasi organisme tersebut. Faktor utama yang mempengaruhi ekologi *V. parahaemolyticus* adalah salinitas, musiman, dan keterkaitan dengan organisme yang lebih tinggi. *V. parahaemolyticus* merupakan organisme yang habitatnya di daerah muara dan jarang ditemukan di air tawar atau air laut dengan salinitas tinggi. Bakteri ini juga menyerang pada musim-musim tertentu, tergantung suhu, semakin tinggi suhu maka semakin rawan adanya serangan dari bakteri ini. Maka dari itu bakteri ini mudah dideteksi pada musim panas. Bakteri *V. parahaemolyticus* hidup pada sekitaran muara sungai (*brackish water* atau *estuaries*), pantai (*coastal waters*) tetapi tidak hidup pada laut dalam (*deep sea*). Bakteri *V. parahaemolyticus* pada terutama hidup di perairan Asia Timur. Bakteri ini tumbuh pada kadar NaCl optimum 3%, kisaran suhu 5-43°C, pH 4.8-11 dan aw 0.94-0.99. Pertumbuhan berlangsung cepat pada kondisi suhu optimum (37°C) dengan waktu generasi hanya 9-10 menit (McLaughlin, 2005).

2.1.3 Karakteristik bakteri *V. parahaemolyticus*

V. parahaemolyticus berasal dari keluarga *Vibriomaceae*, adalah gram negatif, halofilik, non-sporeforming, melengkung berbentuk batang bakteri yang berukuran lebar 0,5-0,8 µm dan panjang 1,4-2,4 µm. Bakteri ini juga memiliki flagel

kutub yang memungkinkan motilitas tinggi di media cair, dan flagel lateral memungkinkan untuk bermigrasi melintasi setengah padat permukaan. Bakteri ini dapat diisolasi dari perairan pesisir dengan suhu di atas 15°C. Organisme ini dapat dideteksi pada sedimen dengan suhu dibawah 15°C. Bakteri ini berasosiasi dengan zooplankton yang akan naik ke permukaan pada suhu hangat. Sebagian besar strain bakteri ini menunjukkan aktivitas hemolisis tipe β bila ditumbuhkan pada agar darah khusus yaitu Wagastuma Agar (Daniels *et al.*, 2000).

2.2 Kandungan Senyawa Aktif Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*)

Tinta cumi-cumi mengandung protein sebesar 10,88% yang terdiri atas asam amino esensial dan non esensial. Tinta cumi-cumi mengandung asam amino esensial yang dominan berupa lisin, leusin, arginin dan fenilalanin. Sementara kadar asam amino non esensial yang dominan adalah asam glutamat dan asam aspartat (Hidayati *et al.*, 2016).

Tinta cumi-cumi maupun tinta sotong mengandung melanin, protein, lemak dan glikosaminoglikan. Melanin dari tinta cumicumi mempunyai aktivitas anti-tumor dengan menghambat aktivitas plasmin untuk meningkatkan thromboxan dan meningkatkan sistem imun untuk membunuh sel kanker, sebagai antioksidan, anti-radiasi, antirotavirus, dan antibakteri. Hasil penelitian Chen *et al.* (2009) menunjukkan bahwa melanin dari tinta cumi-cumi (*Ommastrephes bartrami*) memiliki kemampuan menyerap Cd(II) dan Pb(II) oleh gugus fungsi yang terdapat di molekul melanin. Gugus fungsi tersebut adalah fenolik hidroksil (OH), karboksil (COOH) dan amina (NH). Kemampuan melanin menyerap ion logam inilah yang akan diamati melalui pengujian aktivitasnya terhadap pertumbuhan sel bakteri terutama bakteri Gram negatif. Bakteri Gram negatif pada membran terluar selnya mengandung ion Mg^{2+} dan Ca^{2+} yang berperan penting dalam melindungi kestabilan struktur luar sel (Fitrial dan Khotimah, 2017).

2.3 Bubuk ekstrak tinta cumi-cumi

Banyak manfaat dari cumi-cumi, salah satunya bagian tinta cumi-cumi yang dapat digunakan sebagai obat alternatif karena adanya aktivitas antibakteri yang terkandung didalamnya. Selain itu, kandungan lain yang terdapat pada tinta cumi-cumi antara lain adalah granul, material protein berupa enzim, glukosamin dan fosfolipid yang tersuspensi. Kelenjar tinta pada cumi-cumi diketahui juga mengandung beberapa enzim melanogenik seperti tyrosinase, dopachrome tautomerase dan peroxidase. Enzim tyrosinase merupakan enzim yang memiliki peran penting sebagai pertahanan dalam melawan mikroba. *Tyrosinase* yang merupakan sebuah enzim dalam tinta cumi-cumi memegang peranan penting dalam pertahanan dari mikroba. Studi penelitian terbaru telah menggunakan sejumlah bahan pengawet dan antioksidan dari tinta cumi golongan *Sepia officinalis*. Tinta cumi-cumi dari *Sepiella inermis* telah dipelajari untuk pengobatan antiretroviral. Tinta cumi-cumi juga memiliki antimikroba terhadap bakteri biofilm. (Girija *et al.*, 2012).

Tinta cumi-cumi jenis *L. duvauceli* memiliki zat yang dapat dimurnikan dari tinta. Bakteri *Escherichia coli* ditemukan paling sensitif yang menunjukkan zona yang terhambat pertumbuhannya yang paling besar, diikuti oleh *Salmonella* spp. dan *V. cholerae*. Bakteri Gram positif seperti *Micrococcus* spp. Dan *Staphylococcus* spp. juga terhambat, namun zona tersebut relatif lebih kecil (Nirmale *et al.* 2002).

Tinta cumi-cumi dianggap sebagai salah satu produk limbah dari perikanan yang kurang dioptimalkan kegunaannya dan jarang sekali dimanfaatkan. Padahal berbagai komponen bioaktif amina sederhana dan protein ditemukan dapat melumpuhkan jenis *cephalopoda*. Komponen dari bioaktif tersebut dapat digunakan sebagai pencegahan bakteri patogen. Ekstrak cairan dari tinta cumi-cumi memiliki fungsi sebagai penghambat aktivitas bakteri. Dalam *paper disc test*,

efek penghambat ini ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar lubang yang menenggelamkan media kultur bakteri, dan ternyata berada diluar diameter dari kertas cakram. Diameter pada zona penghambatan menggambarkan kemampuan zat antibakteri dalam konsentrasi yang berbeda. Kandungan asam oleat dalam tinta cumi-cumi dapat menempel di membran bakteri (misalnya, ceragenins dan lipopeptides) dan proteic (lipoglycopeptides) atau lipidic dinding sel (glycodepsipeptides), serta dapat merusak struktur dinding sel dari bakteri (Kenny *et al.* 2009). Aktivitas ini dapat menghancurkan dinding sel dan membran sel dari bakteri tersebut yang dapat menyebabkan kematian dari bakteri dan mengurangi resiko kematian bagi ikan yang dibudidaya. Semakin tinggi konsentrasi saat menggunakan ekstrak tinta cumi-cumi akan memberikan aktivitas penghambatan yang lebih luas. Hal tersebut disebabkan oleh konsentrasi yang digunakan untuk pengobatan memiliki konsentrasi yang tinggi dan semakin tinggi pula jumlah senyawa antibakterinya (Fadjar *et al.*, 2016).

2.4 Uji Daya Hambat secara *In Vitro* dengan Uji Cakram

Uji cakram yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba (Roihana *et al.*, 2012). Metode difusi dilakukan dengan metode Kirby-Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap-tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C selama 15 menit, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi ekstrak, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, setelah kertas cakram menyerap ekstrak tersebut, masing-masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba uji dan diinkubasi selama 18-24 jam, dilakukan pengukuran diameter zona bening, dengan menggunakan penggaris millimeter (Noverita *et al.*,

2009). Prinsip dari metode uji cakram ini adalah semakin besar diameter zona hambat yang terbentuk maka, semakin baik daya hambatnya (Darsana, 2012).

2.5 Biofilm Coverage Rate (BCR)

2.5.1 Definisi Biofilm Coverage Rate (BCR)

Biofilm merupakan kumpulan dari sel-sel mikrobial yang melekat secara ireversibel pada suatu permukaan dan terbungkus dalam matriks *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) yang dihasilkan sendiri serta memperlihatkan adanya perubahan fenotip seperti perubahan tingkat pertumbuhan dan perubahan transkripsi gen dari sel planktonik atau sel bebasnya. Sifat fenotip dari biofilm ini telah mengalami perubahan fenotip dari sel planktonik seperti adanya karakteristik resistensi (Donlan dan Costerton, 2002).

Menurut Jamal *et al.* (2015), menyatakan bahwa biofilm merupakan gabungan dari mikroorganisme yang menyatu menjadi satu, yang dimana sel-selnya saling menempel satu sama lain pada substrat permukaan hidup ataupun permukaan tidak hidup dalam suatu matriks yang dapat diproduksi oleh dirinya sendiri yang menggunakan bahan polimer eskraseluler. Biofilm juga bisa disebut sebagai golongan yang kompleks dari sel mikroba yang dapat menempel dalam substrat berupa matriks eksopolisakarida pada daerah permukaan perangkat medis, dimana infeksi yang berkaitan dengan biofilm dalam peralatan medis dapat menimbulkan masalah yang lebih serius bagi kesehatan masyarakat dan juga dapat mempengaruhi penurunan fungsi dari peralatan medis tersebut.

2.5.2 Struktur Biofilm

Biofilm terdiri dari sel-sel mikroba dan *extracellular polymeric substance* (EPS). EPS dapat mencakup 50% sampai 90% dari total karbon organik biofilm dan dapat dianggap bahan matriks primer biofilm. EPS dapat berbeda sifat kimia dan fisik, tetapi terutama terdiri dari polisakarida. Beberapa polisakarida bersifat netral atau polianionik, seperti EPS bakteri gram negatif. Adanya asam uronik,

seperti *Dglucuronate*, *D-galacturonic*, dan asam manuronat atau piruvat terkait kental menjadi bahan anionik yang menyebabkan asosiasi kation divalen seperti kalsium dan magnesium, yang telah terbukti bereaksi silang dengan benang polimer dan memberikan kekuatan mengikat yang lebih besar dalam pembentukan biofilm. Pada beberapa bakteri gram positif, seperti *Staphylococci*, komposisi kimia dari EPS mungkin sangat berbeda dan terutama bersifat kation (Homenta 2016).

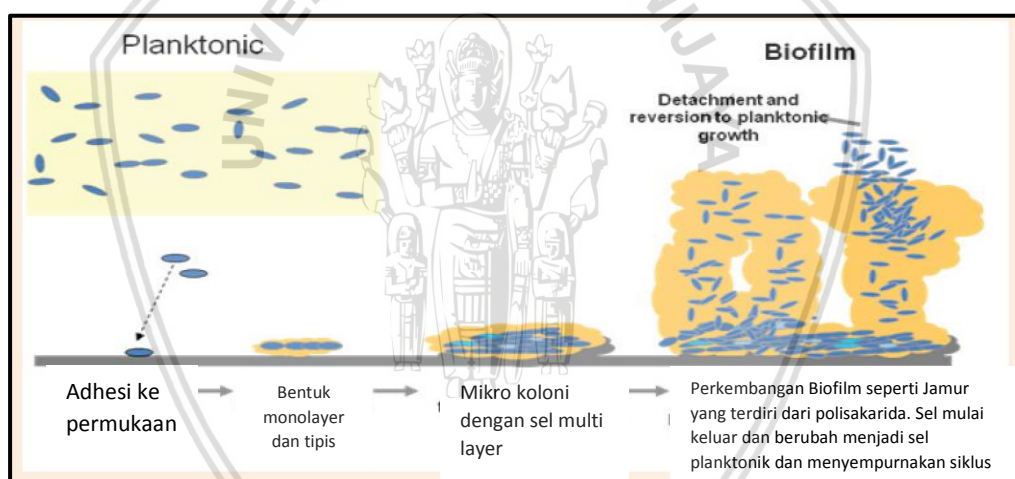
Struktur biofilm bersifat heterogen baik dalam ruang dan waktu, dan terus berubah karena proses eksternal dan internal. Tolker-Nielsen *et al.* (2000) meneliti peran motilitas sel pada struktur biofilm dalam aliran sel dengan memeriksa interaksi *P. aeruginosa* dan *P. putida* dengan mikroskop laser konfokal. Kedua bakteri ini ditambahkan dengan system aliran sel, maka setiap bakteri akan membentuk mikrokoloni. Seiring dengan waktu, koloni akan bercampur yang menunjukkan migrasi sel dari satu mikrokoloni ke yang lain. Perubahan struktur mikrokoloni dari struktur yang kompak menjadi struktur yang longgar, hal ini dapat terjadi karena sel-sel dalam mikrokoloni menjadi motil, di mana sel yang menyebar berasal dari mikrokoloni biofilm.

2.5.3 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm dimulai dari beberapa bakteri yang hidup bebas (sel planktonik) melekat pada suatu permukaan, kemudian memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (monolayer) biofilm. Pada saat ini, pembelahan akan berhenti selama beberapa jam dan pada masa ini terjadi banyak sekali perubahan pada sel planktonik, yang akan menghasilkan transisi sel planktonik menjadi sel dengan fenotip biofilm. Sel biofilm berbeda secara metabolik dan fisiologik dari sel planktoniknya. Sejalan dengan pertumbuhannya, sel bakteri biofilm ini akan menghasilkan EPS (*extracellular polymeric substance*) yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan dan melekatkan satu sama lain untuk membentuk suatu mikrokoloni. Jika sel-sel terus melanjutkan pertumbuhannya dan

membentuk lapisan yang makin tebal, maka mikroba yang melekat pada lapisan terdalam permukaan akan kekurangan zat-zat nutrisi dan terjadi akumulasi produk buangan yang bersifat toksik (Donlan, 2002).

Pembentukan biofilm dimulai dari pelekatan bentuk planktonik ke permukaan dan diikuti adhesi ke permukaan. Tahap ini bersifat reversible. Selanjutnya yaitu menghasilkan pembentukan sel monolayer dan memproduksi lender ekstraseluler. Prosesnya yakni fase pembentukan komunitas mikroba dengan lapisan multiseluler yang tertutup ke dalam matriks ekstrapolimer. Tahapan tersebut bersifat irreversible. Selanjutnya yaitu pengembangan hasil biofilm dari proses penyebaran (Vaseduvan, 2014). Mekanisme pembentukan biofilm dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Mekanisme pembentukan biofilm (Vaseduvan, 2014).

2.5.4 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pembentukan Biofilm

Lingkungan merupakan salah satu faktor yang dapat mempengaruhi pembentukan biofilm. Beberapa faktor lingkungan yang mempengaruhi pembentukan biofilm dijelaskan oleh Garrett *et al.* (2008), yaitu pH dan temperatur. Perubahan pH dapat mempengaruhi pertumbuhan dari bakteri. Variasi nilai pH yang tinggi dapat menimbulkan efek biosidal atau mematikan pada mikroorganisme, termasuk bakteri. pH juga dapat mempengaruhi pembentukan polisakarida. Kisaran pH yang optimum untuk pembentukan polisakarida sangat

bergantung pada spesies, namun sebagian besar bakteri akan memproduksi polisakarida secara optimal pada pH 7 atau netral. Selain pH, faktor kedua yaitu temperatur. Temperatur yang optimum sangat berkaitan dengan peningkatan nutrisi pada biofilm. Metabolisme nutrisi berkaitan langsung dan bergantung pada ketersediaan enzim, sehingga pembentukan biofilm sangat bergantung pada ketersediaan enzim. Temperatur berkaitan dengan reaksi enzim dan berhubungan dengan perkembangan sel. Temperatur yang optimum akan meningkatkan pertumbuhan bakteri, sebaliknya jika temperatur menurun maka pertumbuhan bakteri juga akan menurun. Penurunan temperatur juga dapat menyebabkan penurunan adhesifitas pada beberapa jenis bakteri *Pseudomonas*, sehingga akan menyebabkan penurunan jumlah polimer yang dihasilkan.

Pada dasarnya, mikroorganisme bisa melekat pada permukaan yang memiliki keadaan yang lembab, dapat berkembang biak dan juga dapat membenamkan selnya kedalam matriks berlendir yang terdiri dari zat polimer ekstraseluler (ESP) yang mereka hasilkan dan membentuk suatu biofilm. Biofilm itu sendiri tersusun atas bakteri eksopolisakarida dan *material capsular yeast* dan juga terdapat lapisan pelindung bagi mikroorganisme, hal ini menyebabkan mikroorganisme terlindungi dari proses desikasi, paparan antimikroorganisme dan agen pembersih. Pada beberapa kasus, biofilm biasanya dihuni oleh beberapa spesies tunggal, tetapi pada kasus lainnya biofilm lebih cenderung dihuni oleh mikroba yang memiliki keberagaman (lebih dari satu spesies). Pembentukan biofilm tersebut biasanya terjadi karena adanya permukaan yang mengandung unsur gabungan dari keadaan lingkungan yang memiliki kadar kelembaban yang tinggi dan terdapat nutrisi, hal tersebut yang menyebabkan mikroorganisme untuk hadir dan membentuk biofilm. Beberapa permukaan yang dimaksud yaitu meliputi jaringan hidup, perangkat medis, pipa yang digunakan untuk sistem pengolahan

air minum dan perindustrian serta sistem akuatik alami yang mendukung terjadinya pembentukan biofilm itu sendiri (Purbowati, 2016).

2.6 Antibakteri

Antibakteri dapat dibedakan berdasarkan sifatnya, yaitu bersifat bakteriostatika dan bersifat bakteriosida. Pertama yaitu pengertian dari bakteriostatika, bakteriostatika adalah suatu bahan yang memiliki fungsi untuk menghambat atau menghentikan pertumbuhan pada mikroorganisme (bakteri). Dalam keadaan tersebut jumlah mikroorganisme menjadi stasioner, tidak dapat lagi multiplikasi dan melakukan berkembang biak. Sebagai contohnya yaitu *sulfonamide*, *tetrasiklin*, *kloramfenikol*, *eritromisin* dan *novobisin* (memiliki konsentrasi yang rendah), serta *Para Amino Salicylic Acid* (PAS). Kedua yaitu pengertian dari bakteriosida, bakteriosida merupakan suatu zat atau bahan yang dapat membunuh mikroorganisme (bakteri). Pada sifat ini jumlah mikroorganisme (bakteri) dapat berkurang, bahkan habis, tidak dapat lagi untuk melakukan multiplikasi atau berkembang biak. Salah satu yang termasuk kelompok ini yaitu *penisilin*, *sealosporin*, *neomisin*. Pada mikroorganisme yang bersifat bakteriostatika tidak dapat dikombinasikan dengan antibakteri yang memiliki sifat bakteriosida (Djide, 2008).

Macam-macam antibakteri yang dihasilkan oleh suatu bahan memiliki mekanisme kerja yang berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Nuria *et al.* (2009) menjelaskan bahwa flavonoid, saponin dan tanin mempunyai mekanisme kerja yang berbeda-beda sebagai antibakteri. Mekanisme flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa

intraseluler akan keluar, sedangkan mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim *reverse* transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Peralatan Penelitian

Pada penelitian ini digunakan peralatan yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Peralatan Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1	Autoklaf GEA®	Untuk mensterilkan peralatan yang akan digunakan
2	Lemari Pendingin Cooltech Bio®	Untuk menyimpan bahan pada suhu dingin
3	Cawan petri	Untuk tempat menumbuhkan bakteri
4	Erlenmeyer 50 ml dan 500 ml Pyrex®	Untuk tempat pembuatan media dan maserasi
5	Gelas ukur 100 ml Herma®	Untuk mengukur larutan yang digunakan
6	Bunsen	Untuk pengkondisian aseptis dan mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan
7	Tabung Reaksi	Untuk tempat peremajaan bakteri pada media cair dan tempat pengenceran
8	Hot Plate IEC®	Untuk memanaskan media
9	Timbangan Digital	Untuk menimbang bahan media dan NaCl
10	Timbangan Analitik	Untuk menimbang ekstrak tinta cumi-cumi
11	Vortex Mixer Maxi Mix	Untuk menghomogenkan larutan
12	Mikropipet 10-100µ dan 100-1000µ	Untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan
13	Nampan	Untuk tempat alat yang akan digunakan
14	<i>Washing Bottle</i>	Untuk wadah akuades
15	<i>Sprayer</i>	Untuk wadah alkohol 70%
16	Inkubator redLINE by Binder®	Untuk menginkubasi bakteri yang telah ditanam pada media padat dan cair
17	Spatula	Untuk menghomogenkan larutan
18	Oven redLINE by Binder®	Untuk mengeringkan cawan petri
19	Jarum Ose	Untuk mengambil bakteri yang akan dikultur
20	<i>Microtiter Plate 6 Lubang</i>	Untuk tempat suspensi media, bakteri dan ekstrak saat pembentukan biofilm
21	<i>Rotary Evaporator</i>	Untuk menguapkan tinta cumi-cumi
22	Inkubator	Untuk tempat inkubasi bakteri selama pembentukan biofilm
23	Mikroskop Binokuler	Untuk mengamati biofilm yang terbentuk

24	Rak Tabung Reaksi	Untuk tempat tabung reaksi
----	-------------------	----------------------------

3.1.2 Bahan Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan bahan yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan Penelitian

No.	Bahan	Fungsi
1	Tinta Cumi-cumi	Sebagai bahan pembuatan ekstrak
2	Akuades	Sebagai pelarut pembuatan media dan pelarut ekstrak tinta cumi-cumi
3	Metanol	Sebagai pelarut tinta cumi-cumi saat maserasi
4	Alumunium Foil	Sebagai pembungkus alat agar steril
5	Alkohol 70%	Sebagai bahan pengkondisian aseptis
6	Kapas	Sebagai penutup alat saat sterilisasi
7	Kertas Label	Sebagai penanda
8	Bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>	Sebagai bakteri yang digunakan untuk perlakuan
9	Tisu	Sebagai pembersih alat
10	Kertas	Sebagai pembungkus alat yang disterilisasi
11	Karet Gelang	Sebagai pengikat alat yang disterilisasi
12	Spirtus	Sebagai bahan bakar bunsen
13	Media <i>Tryptic Soy Broth</i> (TSB)	Sebagai media cair peremejaan bakteri <i>V. parahaemolyticus</i>
14	Masker	Sebagai pelindung mulut bagi peneliti agar tidak mengkontaminasi setiap perlakuan yang dilakukan
15	Sarung Tangan	Sebagai bahan untuk mencegah adanya kontaminasi
16	Plastik Wrap	Sebagai pembungkus bagian sisi cawan petri
17	Cover Glass	Sebagai substrat pembentukan biofilm
18	Etanol 99%	Sebagai pembersih cover glass dari sisa pewarna
19	Kristal Violet	Sebagai pewarna biofilm
20	NaCl	Sebagai bahan media kultur bakteri

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian merupakan cara berfikir, berbuat yang dipersiapkan baik-baik untuk mengadakan penelitian dan mencapai suatu tujuan penelitian. Metode yang dipilih berhubungan erat dengan prosedur, alat serta desain

penelitian yang digunakan. Metode penelitian memandu peneliti tentang urutan bagaimana penelitian dilakukan. Metode penelitian membicarakan bagaimana secara berurutan suatu penelitian dilakukan, yaitu dengan alat apa dan prosedur bagaimana suatu penelitian dilakukan (Hamdi dan Bahruddin, 2014).

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Nazir (2005), penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan dari penelitian eksperimental adalah menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat serta seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk penelitian.

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian merupakan gambaran umum penelitian yang akan dilaksanakan oleh peneliti untuk mencapai tujuan tertentu. Rancangan penelitian disajikan dalam satu kesatuan naskah yang ringkas dan utuh. Rancangan penelitian menunjukkan adanya format penulisan yang disusun secara sistematis dan operasional meliputi langkah-langkah dan tahapan yang harus dijalani oleh peneliti. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Menurut Hanafiah (2013), Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan rancangan lainnya. Dalam rancangan ini tidak terdapat lokal kontrol, sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dengan galat. Kondisi ini hanya dicapai di ruangan-ruangan terkontrol seperti di laboratorium. Adapun model rancangan acak lengkap yang secara umum dinyatakan dalam model matematika adalah sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = Nilai tengah umum

T_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = Pengaruh gallat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Variabel bebas yang digunakan pada penelitian ini yaitu pemberian Ekstrak tinta cumi-cumi dengan dosis yang berbeda pada media pembentukan biofilm. Pemberian dosis didasarkan pada penelitian pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya, yaitu penentuan dosis minimal ekstrak tinta cumi-cumi yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan uji MIC (*Minimal Inhibiting Concentration*). Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali ulangan, sehingga jumlah total sampel yang terdapat pada penelitian ini adalah sebanyak 15 sampel. Berikut adalah jenis perlakuan pada penelitian ini:

K (-) : Media pembentukan biofilm tanpa penambahan ekstrak tinta cumi- cumi.

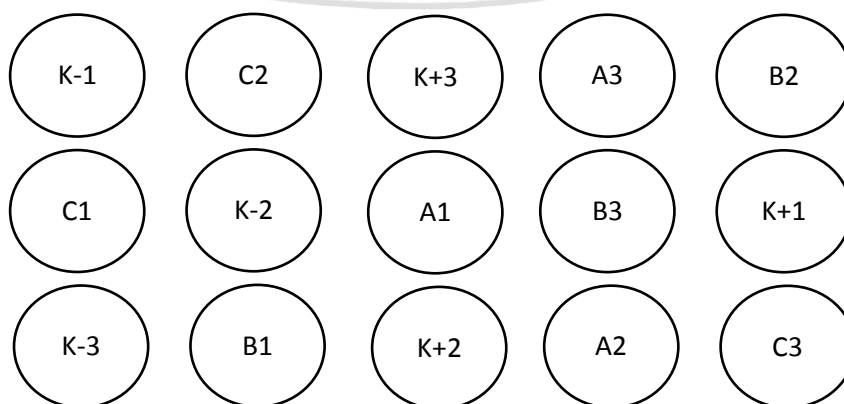
A : Penambahan ekstrak tinta cumi-cumi dengan dosis 150 ppm

B : Penambahan ekstrak tinta cumi-cumi dengan dosis 200 ppm

C : Penambahan ekstrak tinta cumi-cumi dengan dosis 250 ppm

K (+) : Media pembentukan biofilm ditambahkan antibiotik *oxytetracylin*.

Denah penelitian disajikan pada Gambar 3 berikut ini:



Gambar 3. Denah penelitian

Keterangan:

A-B-C : perlakuan

K + : kontrol positif

K - : kontrol negatif

1-2-3 : ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi

Pembuatan bubuk ekstrak tinta cumi-cumi dimulai dari pengambilan pengambilan tinta cumi-cumi yang didatangkan dari Malang Selatan (Sendang Biru) dalam keadaan segar. Kemudian pengambilan tinta dilakukan dengan cara menggunting bagian mantel cumi-cumi lagi diambil bagian kantong tinta cumi-cuminya. Pengambilan kantong tinta cumi-cumi dilakukan dengan bantuan pinset agar kantong cumi-cumi tidak rusak saat diambil. Selanjutnya kantong tinta cumi-cumi diletakkan di wadah. Kemudian kantong tersebut disobek dan diperas hingga tinta cumi-cumi keluar semua. Selanjutnya dilakukan proses maserasi yaitu dengan cara mencampurkan tinta cumi dengan larutan pelarut. Larutan yang digunakan pada penelitian ini yaitu metanol. Perbandingan tinta cumi-cumi dan metanol adalah 1:3. Kemudian bahan tersebut dimasukkan dalam toples yang kedap udara. Lalu ditutup menggunakan plastik berwarna hitam, dipastikan seluruh bagian toples sudah tertutupi oleh plastik hitam tersebut. Kemudian toples tersebut disimpan pada suhu ruang selama 7 hari.

Setelah proses maserasi selama 7 hari, selanjutnya dilakukan proses evaporasi dengan bantuan alat *rotary evaporator*. Alat tersebut dijalankan dengan kecepatan putaran yaitu 80 rpm selama lebih kurang 5-6 jam. Hasil dari proses evaporasi adalah ekstrak tinta cumi-cumi dalam bentuk pasta. Proses selanjutnya adalah *spray dry*. *Spray dryer* merupakan alat yang digunakan untuk proses

pengeringan dengan cara mengubah wujud benda dari cair menjadi bubuk halus atau butiran kecil fluida dengan bantuan alat pembutiran (*atomizer*) dan pengeringan udara panas yang dialirkan kedalam sebuah ruang pengering (*drying chamber*). Alat pembutiran fluida yang umum digunakan yaitu jenis roda berputar (*rotary wheel atomizer*) dan nosel bertekanan (*pressure nozzle atomizer*). Ruang pengeringan memiliki fungsi sebagai tempat penguapan air yang ada bersama dengan butiran fluida. Setelah fluida menguap, maka menghasilkan butiran halus produk kering yang jatuh kedalam bak penampungan dibawah ruang pengeringan. Komposisi bahan pencampur saat akan dilakukan *spray dry* yaitu 1 ml ekstrak tinta cumi-cumi : 30 ml aquades : 30% malto dextrin dari jumlah aquades.

3.3.2 Sterilisasi

Menurut Achmad *et al.* (2011), sterilisasi adalah suatu cara untuk membebaskan benda dari jasad hidup. Sterilisasi dapat dilakukan dengan cara cara fisik, kimia, maupun mekanik. Sterilisasi peralatan dapat dilakukan secara fisik dengan pemanasan. Sterilisasi yang lazim digunakan adalah sterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan waktu tertentu tergantung dengan suhu, yaitu pada suhu 121°C selama 15 menit atau suhu 115°C selama 30 menit.

Proses sterilisasi dengan menggunakan autoklaf dilakukan dengan cara berikut:

- a. Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas kemudian diikat dengan menggunakan tali. (tabung reaksi dan erlenmeyer pada bagian atas ditutup dengan kapas).
- b. Aquades dituangkan secukupnya ke dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas dimasukkan ke dalam autoklaf dan autoklaf ditutup secara diagonal.
- c. Klep keluarnya uap dipastikan berada dalam posisi berdiri atau tegak.

- d. Autoklaf dinyalakan pada posisi ON, hingga lampu power menunjukkan warna kuning.
- e. Temperatur diputar pada posisi maksimal, sehingga warna lampu *heating* berwarna hijau, kemudian dibiarkan hingga keluar uap air dari klep lalu klep ditutup kearah samping.
- f. Tunggu sampai jarum menunjukkan suhu sterilisasi (121°C), kemudian temperatur diturunkan sampai lampu pada *sterilizing* berwarna kuning.
- g. *Timer* diatur pada posisi 15 menit. Ketika alarm berbunyi, menunjukkan sterilisasi berakhir.
- h. Autoklaf dimatikan. Klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0.
- i. Autoklaf dibuka secara diagonal dan diambil alat yang sudah disterilisasi lalu disimpan dalam inkubator, bahan yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin.

3.3.3 Pembuatan Media *Tryptic Soy Broth* (TSB)

Media TSB merupakan media cair yang digunakan untuk melakukan peremajaan bakteri *V. parahemolyticus*. Proses pembuatan media TSB adalah sebagai berikut:

- Media TSB ditimbang sebanyak yang diperlukan dengan ketentuan 30gram/liter.
- Tiga garam ditambahkan dengan ketentuan NaCl 18,4 gr/liter, KCl 0,75 gr/liter dan MgSO₄ 6,94 gr/liter.
- Media dan NaCl dimasukkan ke dalam erlenmayer dan dihomogenkan.
- Setelah homogen, media dipindahkan ke dalam tabung reaksi 10 ml menggunakan pipet volume sebanyak 9 ml pada masing-masing tabung.
- Bagian mulut tabung reaksi ditutup menggunakan kapas.

- Tabung reaksi diletakkan pada *beaker glass* sebagai tempat saat sterilisasi, kemudian ditutup bagian mulut *beaker glass* menggunakan aluminium foil.
- Media kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Media siap untuk digunakan.

3.3.4 Kultur Bakteri *V. parahaemolyticus*

Biakan murni bakteri *V. parahaemolyticus* didapatkan dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara yang terdapat di media agar miring. Kultur bakteri *V. parahaemolyticus* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Biakan pada media agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores.
2. Ose yang sudah terdapat bakteri dicelupkan pada media TSB yang sudah disiapkan.
3. Media disimpan pada *incubator shaker* dengan suhu 33°C selama 2 x 24 jam.
4. Semua kegiatan pengkulturan dilakukan secara steril.
5. Kepadatan bakteri hasil kultur dicocokkan menggunakan metode standar *McFarland*.

3.3.5 Parameter Uji

a. Uji *Minimum Inhibiting Concentration* (MIC)

Prosedur kerja uji *Minimum Inhibiting Concentration* (MIC) yang dilakukan pada penelitian ini adalah sebagai berikut ini:

- Tabung reaksi diisi dengan media TSB steril sebanyak 4,5 ml
- 3 buah tabung reaksi disiapkan dan masing-masing ditambahkan bubuk ekstrak tinta cumi-cumi masing-masing 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm dan 1000 ppm.

- 1 tabung reaksi disiapkan sebagai kontrol positif dengan penambahan 5 ppm antibiotik *oxytetracyclin* dan 1 tabung reaksi sebagai kontrol negatif tanpa penambahan antibiotik maupun bubuk ekstrak tinta cumi-cumi.
- Bakteri *V. parahaemolyticus* ditambahkan sebanyak 0,1 ml menggunakan mikropipet.
- Media diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 33°C.
- Media dicek kekeruhan akhirnya (OD) menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm
- Nilai absorbansi yang tertera pada monitor spektrofotometer dicatat sebagai OD.

b. Uji Cakram (daya hambat)

Uji cakram dilakukan untuk mengetahui daya hambat pemberian ekstrak tinta cumi-cumi dengan pelarut metanol yang dapat dilihat pada diameter zona bening yang berada disekeliling kertas cakram. Langkah uji cakram adalah sebagai berikut:

1. Cawan petri yang telah terdapat media TCBSA disiapkan terlebih dahulu.
2. Kertas cakram steril direndam pada ekstrak dengan konsentrasi 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm. Perlakuan kontrol positif kertas cakram direndam ke dalam antibiotik *oxytetracyclin* 5 ppm. Perlakuan kontrol negatif direndam dalam DMSO 10%.
3. Bakteri *V. parahaemolyticus* dengan kepadatan 10^8 diambil menggunakan *cotton swap*.
4. Bakteri *V. parahaemolyticus* diratakan keseluruh permukaan media dengan menggunakan *cotton swap*.
5. Setelah ± 15 menit kertas cakram direndam, lalu diangkat dengan hati-hati diletakkan pada media agar bagian tengah.

6. Kemudian media diinkubasi pada suhu 33°C selama 18-24 jam.
7. Media diamati dengan cara mengukur diameter zona hambat menggunakan jangka sorong.

c. Uji Pembentukan dan Pertumbuhan Biofilm Bakteri *V. parahaemolyticus*

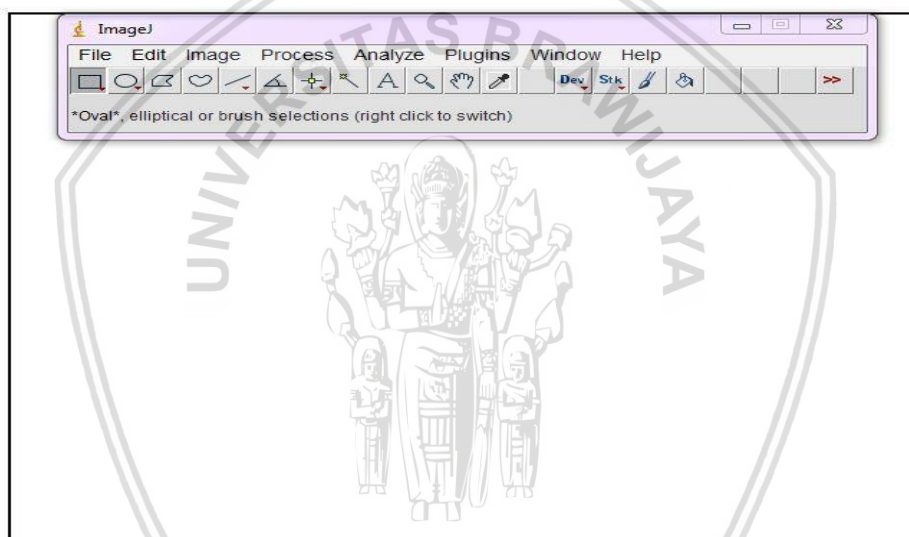
Uji pembentukan dan pertumbuhan biofilm bakteri *V. parahaemolyticus* dilakukan dengan metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* dengan beberapa modifikasi. Alat yang digunakan yaitu *microtiter plate flat bottom 6 wells* yang telah terlebih dahulu disterilisasi dan *cover glass* steril sebagai substrat pembentukan biofilm yang akan diamati.

Langkah pertama yang harus dilakukan menyiapkan media dan bubuk ekstrak tinta cumi-cumi. Media yang digunakan adalah media TSB. Langkah selanjutnya yaitu memasukkan *cover glass* steril ke dalam masing-masing lubang *microtiter plate* menggunakan pinset kemudian media TSB sebanyak 4,5 ml dimasukkan ke dalam *microtiter plate* diikuti dengan penambahan ekstrak tinta cumi-cumi 1 ml dan suspensi bakteri 0,1 ml. Masing-masing perlakuan diulangi sebanyak tiga kali. *Microtiter plate* yang telah berisi media, ekstrak dan bakteri kemudian dilapisi *plastic wrap* pada bagian atasnya dan diinkubasi pada inkubator dengan suhu 25°C selama 7 hari. Menurut Hiraki, *et al.* (2009), biofilm akan mencapai konsentrasi tertinggi setelah 7 hari inkubasi. Pemanenan ini dilakukan setelah 7 hari inkubasi, yaitu dengan cara mencuci *microtiter plate* dengan menggunakan *Phospat Buffered Saline* (PBS) untuk menghilangkan suspensi bakteri yang bersifat planktonik. Kemudian diambil *cover glass* menggunakan pinset. Selanjutnya yaitu dilakukan pewarnaan pada *cover glass* menggunakan pewarna *crystal violet* dan dibiarkan selama 5 menit agar warnanya benar-benar terserap. Kemudian *cover glass* difiksasi menggunakan etanol 95% dan dibiarkan hingga kering.

3.4 Pengambilan Data

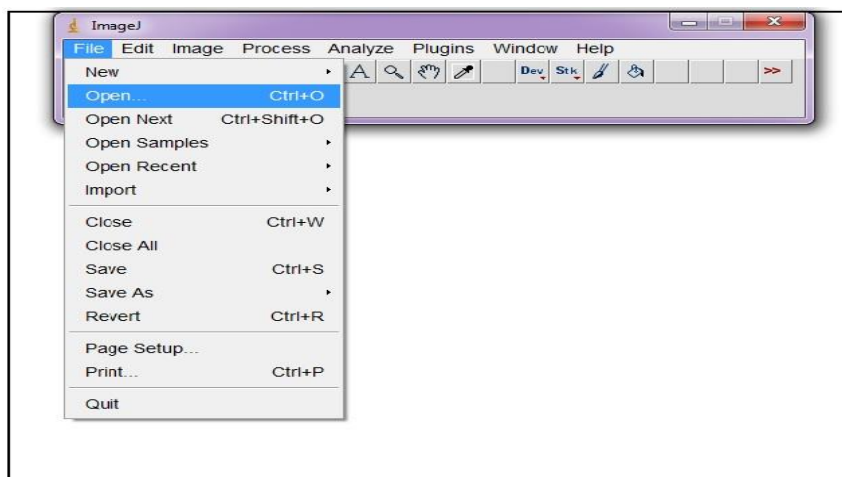
Hasil dari pewarnaan diamati menggunakan mikroskop dan diambil gambarnya pada lima bidang pandang secara acak. Hasil pemotretan *full colour* diubah menjadi *grayscale* menggunakan software Image-J. Langkah-langkah penggunaan software Image-J yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut ini:

Pertama yaitu mengunduh software Image-J yang sudah tersedia di <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>. Setelah dilakukan pengunduhan maka muncul tampilan awal seperti yang disahkan pada Gambar 4.



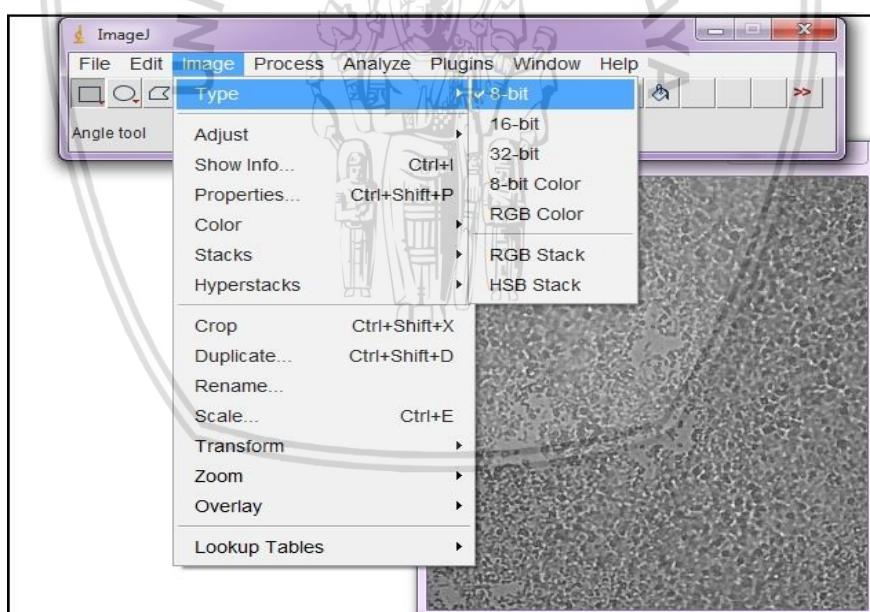
Gambar 4. Tampilan Awal Software Image-J

Kedua yaitu dengan memilih gambar yang akan dianalisis dengan cara memilih menu *File*, kemudian pilih *Open* dan pilih gambar yang akan dipilih pada folder yang menuju. Langkah pemilihan gambar akan disajikan pada Gambar 5.



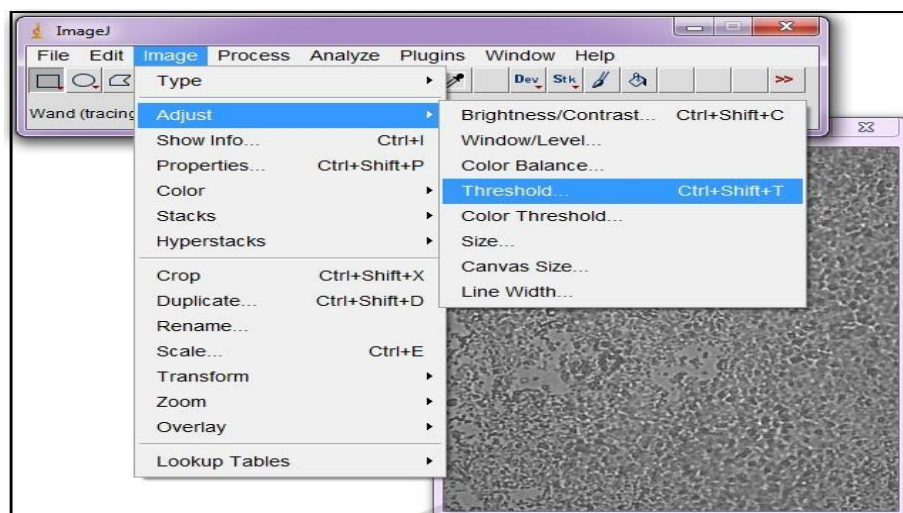
Gambar 5. Langkah Pemilihan Gambar

Gambar yang telah dipilih merupakan hasil pemotretan yang *fullcolour* sehingga harus diubah dalam format *grayscale* dengan cara klik menu *Image*, pilih *Type*, klik 8 bit maka gambar akan berubah dalam format *grayscale*. Langkah mengubah gambar menjadi *grayscale* disajikan pada Gambar 6.



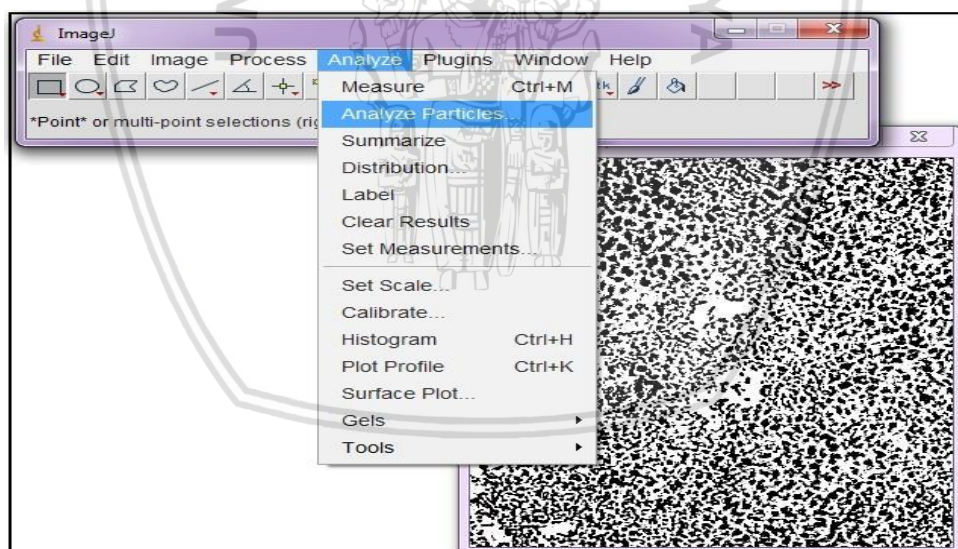
Gambar 6. Merubah Format Gambar menjadi *grayscale*

Kemudian menampilkan gambar menjadi *Black and White*. Cara yang harus dilakukan yaitu dengan memilih menu *Image*, klik *Adjust*, kemudian pilih *Threshold*. Langkah untuk menampilkan gambar menjadi *Black and White* disajikan pada Gambar 7.



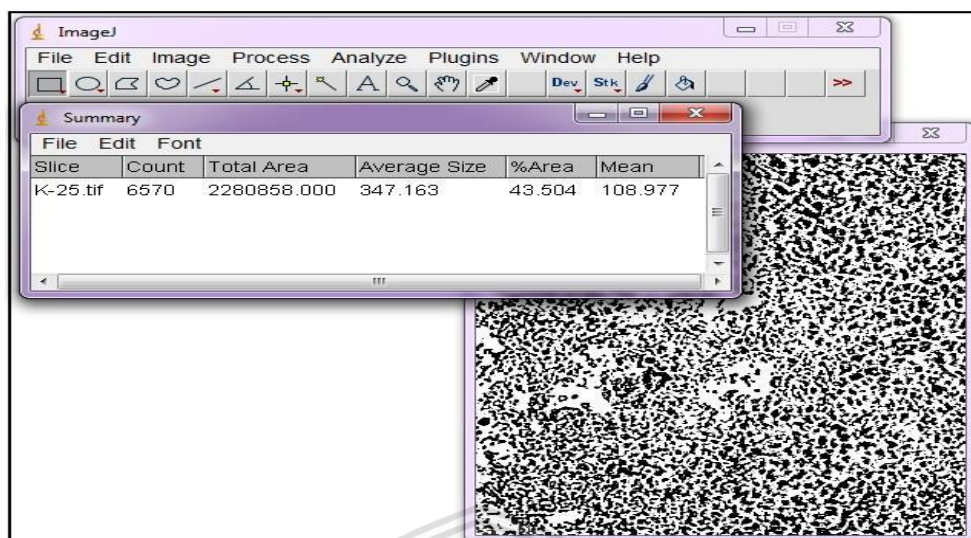
Gambar 7. Menampilkan Gambar menjadi *Black and White*

Langkah terakhir yaitu dengan menampilkan nilai BCR dengan cara klik *Analyze*, kemudian klik *Analyze Particles* hingga muncul kotak dialog *Analyze Particles*, kemudian klik OK. Langkah untuk menampilkan analisis nilai BCR ditampilkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Langkah Menampilkan Analisis Nilai BCR

Nilai BCR akan ditampilkan pada kotak dialog *Summary* seperti yang disajikan pada Gambar 9.



Gambar 9. Kotak Dialog Summary

3.5 Analisis Data

Data yang didapatkan selanjutnya akan dilakukan analisis secara statistik menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Data yang dilakukan analisis yaitu data *Biofilm Coverage Rate* (BCR). Tujuan melakukan pengujian menggunakan analisis keragaman untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon dari parameter yang diujikan. Perlakuan dikatakan memberikan pengaruh apabila nilai F hitung melebihi nilai F tabel yang digunakan. Apabila perlakuan dinyatakan berpengaruh maka akan dilanjutkan dengan menggunakan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang digunakan untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan hasil terbaik dengan selang kepercayaan 95% serta dapat mengetahui perbedaan perlakuan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji *Minimum Inhibiting Concentration* (MIC)

Uji MIC merupakan suatu uji untuk mengetahui dosis minimum bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) yang akan digunakan pada penelitian ini. Pengujian MIC menggunakan 3 perlakuan bubuk ekstrak dengan dosis yang berbeda dan 2 perlakuan kontrol. Dosis dari bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) yaitu 250 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm, sedangkan perlakuan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif menggunakan antibiotik *oxytetracyclin* dengan dosis 5 ppm.

Hasil MIC pertama menunjukkan hasil yang berbeda setelah diuji pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Pengujian pada spektrofotometer didasarkan pada pembacaan nilai absorbansinya, hal tersebut dilakukan karena pengamatan secara visual sulit dilakukan dan tidak mendapatkan hasil yang valid. Menurut Assidqi et al. (2012), pengujian MIC yang diamati secara visual memiliki kekurangan yaitu sulit membedakan tingkat kekeruhan secara pasti, oleh karena itu perlu dilakukan pengamatan dengan spektrofotometer agar mendapatkan hasil yang lebih valid. Hasil MIC perlakuan yang mendekati kontrol positif dianggap mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji MIC bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) terhadap pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji MIC Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.) terhadap Pertumbuhan Bakteri *V. parahaemolyticus*

Dosis (ppm)	OD (nm)
250 ppm	1,263
500 ppm	1,308
1000 ppm	1,448
K+ (<i>Oxytetracyclin</i>)	1,245
K- (Tanpa perlakuan)	1,667

Hasil MIC pada Tabel 3 menunjukkan nilai OD terendah pada perlakuan A sebesar 1,263 nm, OD tertinggi pada kontrol negatif sebesar 1,667 nm, OD kontrol positif berada diantara keduanya sebesar 1,245 nm. Nilai OD perlakuan A adalah nilai perlakuan yang paling mendekati perlakuan kontrol positif. Hal tersebut berarti pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan dosis 250 sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus*. Hal tersebut didukung dengan pernyataan Assidqi *et al.* (2012), yang menyatakan bahwa hasil pembacaan uji MIC dengan menggunakan spektrofotometer, apabila selisih nilai OD antara konsentrasi ekstrak yang belum diinokulasi bakteri dengan yang telah diinokulasi bakteri mendekati kontrol positif, maka konsentrasi ekstrak dianggap mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Semakin tinggi pemberian dosis dari bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) maka semakin tinggi nilai OD. Hal ini sesuai dengan pendapat Munfaati, *et al.* (2015), jumlah sel bakteri dapat diukur dengan mengetahui kekeruhan atau turbiditas kultur, apabila semakin keruh suatu media kultur maka jumlah selnya semakin banyak. Nilai OD dapat menunjukkan besarnya cahaya yang dapat diserap oleh sel dinyatakan berbanding lurus dengan jumlah sel yang ada, sehingga dapat diartikan bahwa semakin tinggi konsentrasi dari ekstrak yang diberikan maka semakin besar aktivitas penghambatannya. Menurut pendapat Rahmawati, *et al.* (2015), bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu zat antibakteri maka semakin tinggi daya antibakterinya.

Hasil uji MIC pada Tabel 3 juga menunjukkan bahwa penambahan dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dari konsentrasi rendah ke konsentrasi tinggi menghasilkan nilai ΔOD yang semakin meningkat. Artinya, semakin tinggi dosis pemberian ekstrak, maka pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus* juga akan semakin meningkat. Hal tersebut dimungkinkan karena kandungan protein yang terdapat pada tinta cumi-cumi. Menurut Agusandi *et al.* (2013), tinta cumi-cumi mengandung butir-butir melanin atau pigmen hitam. Melanin alami adalah

melanoprotein yang mengandung 10-15% protein. Radji dan Biomed (2011) menyebutkan bahwa nutrisi yang dibutuhkan oleh pertumbuhan mikroorganisme yaitu karbon, nitrogen, unsur non logam, unsur logam, vitamin dan air. Bakteri membutuhkan sumber-sumber makanan yang mengandung C, H, O dan N yang berguna untuk menyusun protoplasma. Karbon merupakan unsur utama untuk metabolisme bakteri, sehingga dapat dijadikan sebagai sumber nutrisi bakteri. Sumber karbon dapat diperoleh dari karbohidrat, protein dan lemak. Berdasarkan pendapat diatas, dimungkinkan bahwa kandungan protein yang terdapat pada ekstrak tinta cumi-cumi, pada dosis tertentu dapat dimanfaatkan sebagai nutrisi oleh bakteri, sehingga menyebabkan pertumbuhannya semakin meningkat. Hal tersebut juga dapat dilihat dari nilai OD yang semakin meningkat karena adanya penambahan dosis dari 250 ppm, 500 ppm dan 1000 ppm. Sehingga dalam penelitian ini, menggunakan dosis 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm karena pada dosis 250 ppm memiliki nilai OD yang paling rendah.

4.2 Uji Cakram (Daya Hambat)

Uji cakram dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram *Kirby bauer* untuk menentukan *minimum inhibitory concentration* (MIC). Perlakuan difusi cakram lebih mudah dilakukan karena menggunakan alat yaitu *paper disk* dibandingkan dengan metode sumuran dan metode dilusi. Metode sumuran harus memerlukan keahlian dan ketelitian dalam membuat ring sumuran, sedangkan metode dilusi harus menggunakan ketelitian dalam membuat media dengan ketebalan yang sama dan dalam menginokulasikan bakteri dengan jumlah yang sama persis (Syarifuddin *et al.*, 2014).

Menurut Yanti dan Mitika (2017), pengujian daya hambat dilakukan dengan metode cakram lalu diinkubasi dan diukur zona hambat. Zona hambat ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar cakram. Zona bening tersebut diukur menggunakan jangka sorong digital.

Dosis pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) pada uji cakram yaitu 150 ppm, 200 ppm, dan 250 ppm dengan masing-masing ulangan sebanyak 3 kali. Hasil dari uji cakram didapat dari menghitung diameter zona hambat yang terbentuk pada media. Hasil uji cakram bakteri *V. parahaemolyticus* disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat

Perlakuan	Zona Bening (mm)			Total (mm)	Rerata \pm SD
	1	2	3		
A	8,81	8,98	8,93	26,72	8,91 \pm 0,09
B	9,77	9,60	9,91	29,28	9,76 \pm 0,16
C	10,26	10,69	9,92	30,87	10,29 \pm 0,39

Keterangan :

A = Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) dengan dosis 150 ppm

B = Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) dengan dosis 200 ppm

C = Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) dengan dosis 250 ppm

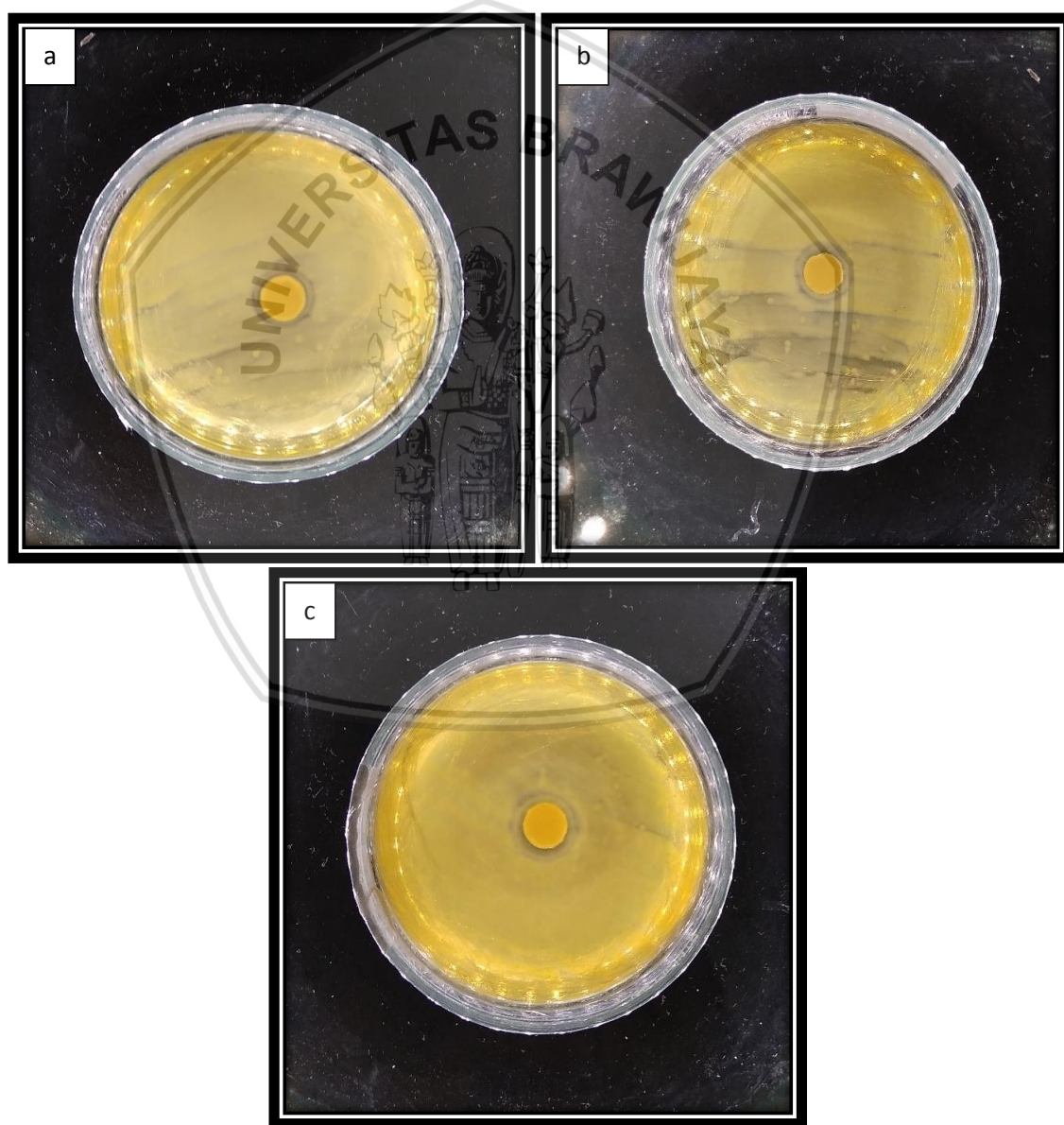
Rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan pada perlakuan A dengan dosis 150 ppm sebesar 8,91 mm, perlakuan B dengan dosis 200 ppm sebesar 9,76 mm dan perlakuan C dengan dosis 250 ppm sebesar 10,29 mm. Perolehan hasil zona hambat diklasifikasikan berdasarkan kekuatan ekstrak dalam penghambatan bakteri. Klasifikasi tersebut didasari dengan lebar zona hambat yang terbentuk. Menurut Fadjar *et al.* (2016), klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
<5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
10-19 mm	Kuat
\geq 20 mm	Sangat Kuat

Berdasarkan klasifikasi di atas, hasil penelitian zona hambat yang terbentuk termasuk kategori sedang. Hasil zona hambat terendah adalah perlakuan A yaitu 8,91 mm, sedangkan zona hambat tertinggi adalah perlakuan C

yaitu dengan rata-rata sebesar 10,29 mm. Semakin tinggi konsentrasi pada perlakuan semakin tinggi pula zona hambatnya, sesuai dengan pendapat Syarifuddin *et al.* (2014), konsentrasi dari antibakteri dapat mempengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri, dimana semakin besar konsentrasi antibakteri maka semakin luas pula zona penghambat yang terbentuk. Hasil zona hambat yang terbentuk setelah inkubasi selama 24 jam dari 3 perlakuan disajikan pada Gambar 10.



Gambar 10. Zona Hambat (a) 150 ppm; (b) 200 ppm; dan (c) 250 ppm.

Selanjutnya, dilakukan analisis sidik ragam dengan tujuan untuk mengetahui pengaruh dalam setiap perlakuan dosis yang diterapkan. Analisis sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Analisis Sidik Ragam (Daya Hambat)

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F.5%	F.1%
Perlakuan	2	2,92	1,46	24,27**	5.14	10.92
Acak	6	0,36	0,06			
Total	8	3,28				

Keterangan

** (berbeda sangat nyata)

Hasil yang diperoleh dari Tabel 6 menunjukkan bahwa pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi dinyatakan memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *V. parahaemolyticus*. Hal tersebut didasari oleh hasil dari F hitung yang menunjukkan nilai lebih besar jika dibandingkan dengan nilai F tabel 5% dan F tabel 1%. Hasil F hitung adalah 24,27 dan F tabel 5% sebesar 5,14 sedangkan F tabel 1% sebesar 10,92. Selanjutnya, dari hasil di atas perlu diketahui nilai beda nyata terkecil pada tiap perlakuan. Oleh karena itu, perlu dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil). Tabel uji BNT (Beda Nyata Terkecil) disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Perlakuan	A (8,91)	B (9,76)	C (10,29)	Notasi
A (8,91)	-			a
B (9,76)	0,85 ^{ns}	-		a
C (10,29)	1,38**	0,53 ^{ns}	-	ab

Keterangan:

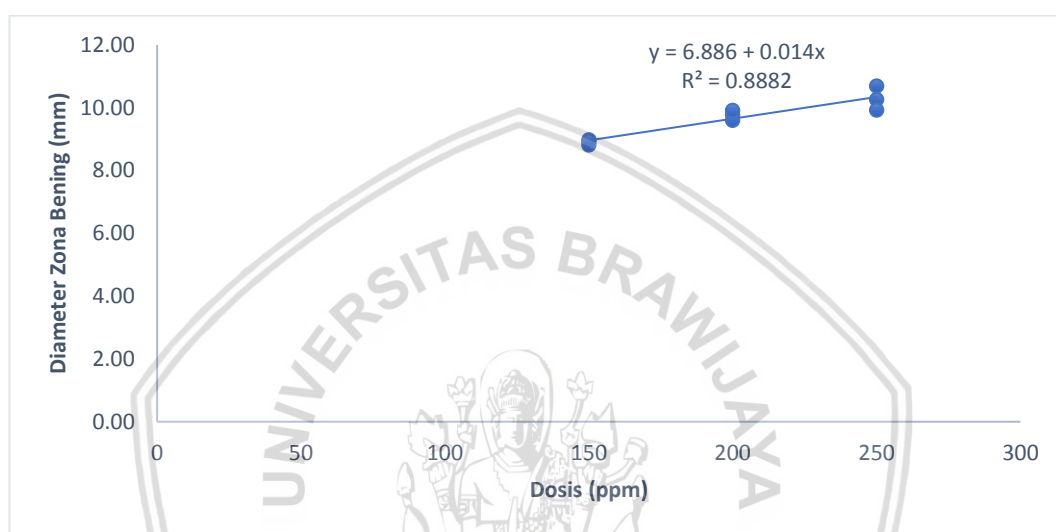
ns = tidak berbeda,

** = berbeda sangat nyata

Berdasarkan tabel diatas, perlakuan B dan A tidak memberikan perlakuan yang nyata. Perlakuan C dengan A memberikan pengaruh yang

berbeda sangat nyata. Perlakuan B dan C tidak memberikan perlakuan yang nyata.

Selanjutnya, untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter uji maka dilakukan perhitungan uji polinomial orthogonal pada Lampiran 3. Berdasarkan hasil perhitungan tersebut maka terbentuk grafik regresi diameter zona hambat yang dihasilkan pada setiap perlakuan seperti pada Gambar 11.



Gambar 11. Grafik Hubungan Zona Hambat dengan Dosis Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) terhadap Bakteri *V. parahaemolyticus*

Gambar diatas menunjukkan hubungan antara pemberian dosis yang berbeda terhadap zona hambat yang terbentuk. Kedua hubungan tersebut membentuk pola linier dengan persamaan $y = 6.886 + 0.014x$ dan koefisien $R^2 = 0,8882$. Berdasarkan grafik diatas maka diketahui bahwa dengan adanya peningkatan pemberian dosis bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dapat mengakibatkan peningkatan pembentukan zona hambat. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian dari Fadjar, *et al.* (2016), bahwa ekstrak dari tinta cumi memberikan nilai daya hambat yang lebih besar dibandingkan dengan kontrol, namun terjadi perbedaan yang signifikan antara dosis perlakuan. Semua konsentrasi dapat digunakan sebagai konsentrasi penghambat tetapi konsentrasi yang efisien adalah $265,5 \text{ mg L}^{-1}$ yang dapat digunakan sebagai anti-vibriosis

terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*, semakin tinggi konsentrasi ekstrak tinta cumi-cumi dapat memberikan aktivitas penghambatan yang lebih luas.

Peningkatan zona hambat terjadi karena adanya peningkatan senyawa katif pada bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) sehingga pembentukan zona hambat semakin besar. Menurut pendapat dari Katno, *et al.* (2009), seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak maka terdapat kecenderungan peningkatan diameter zona daerah hambatan bakteri uji. Besarnya perbedaan daerah zona hambatan masing-masing konsentrasi akibat adanya perbedaan besarnya kandungan senyawa aktif, karena faktor-faktor yang mempengaruhi uji daya hambat adalah konsentrasi senyawa aktif, kepekaan pertumbuhan mikroba uji, ketebalan dan viskositas medium serta adanya reaksi zat aktif dengan medium dan suhu inkubasi.

4.3 Biofilm Coverage Rate (BCR)

Nilai BCR merupakan persentase yang diperoleh dari adanya tutupan biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus* pada suatu substrat berupa *cover glass*. Hasil nilai tersebut diperoleh dari analisis gambar preparat menggunakan software Image-J. Nilai BCR yang dihasilkan oleh bakteri *V. parahaemolyticus* dengan pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Nilai BCR *V. parahaemolyticus* dengan pemberian bubuk Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata \pm SD
	1	2	3		
A	10,84	9,26	11,21	31,31	10,44 \pm 1,04
B	16,39	12,82	14,59	43,80	14,60 \pm 1,79
C	19,47	16,90	17,77	54,14	18,05 \pm 1,31

Keterangan :

- A = Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) dosis 150 ppm
- B = Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) dosis 200 ppm
- C = Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*) dosis 250 ppm

Nilai BCR pada Tabel 8. menunjukkan adanya perbedaan pada masing-masing perlakuan. Rata-rata nilai BCR tertinggi diperoleh pada perlakuan C (dosis ekstrak tinta cumi-cumi sebesar 250 ppm) yaitu sebesar 18,05%. Setelah mendapatkan rata-rata dari setiap perlakuan, maka dilanjutkan dengan analisis sidik ragam untuk mengetahui apakah pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) berpengaruh terhadap BCR bakteri *V. parahaemolyticus*. Hasil analisis sidik ragam disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Analisis Sidik Ragam BCR *V. parahaemolyticus* dengan pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.)

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	87,12	43,56	21,90**	5,14	10,92
Acak	6	11,94	1,99			
Total	8	99,06				

Keterangan

** (berbeda sangat nyata)

Berdasarkan Tabel 9 analisis sidik ragam diatas menunjukkan bahwa dengan pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) memberikan pengaruh nyata terhadap BCR bakteri *V. parahaemolyticus*. Hal tersebut dapat diketahui dari nilai F hitung berada diantara F tabel 5% dan 1%, yaitu sebesar 21,90. Hasil yang didapatkan berbeda nyata sehingga dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yang ada. Hasil dari uji BNT disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil Uji BNT Ragam BCR *V. parahaemolyticus* dengan Pemberian Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.).

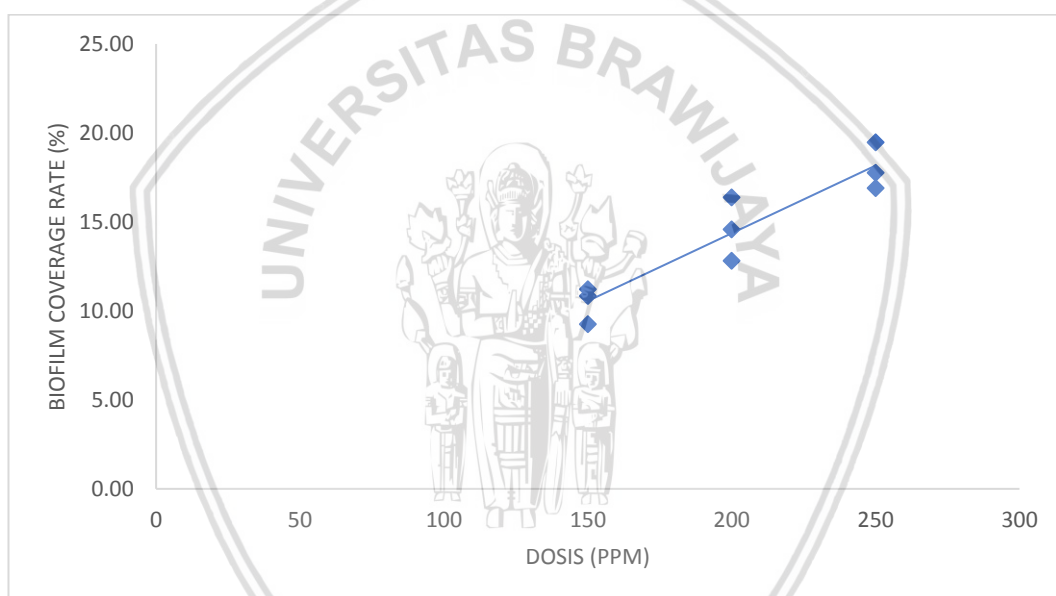
Perlakuan	A (10,44)	B (14,60)	C (18,05)	Notasi
A (10,44)	-			a
B (14,60)	4,16*	-		b
C (18,05)	7,61**	3,45*	-	c

Keterangan

* (berbeda nyata)

** berbeda sangat nyata

Hasil dari uji BNT pada Tabel 10 menunjukkan bahwa nilai BCR pada perlakuan B berbeda nyata dengan perlakuan A sehingga diberi notasi b. Perlakuan C berbeda sangat nyata dengan perlakuan A namun berbeda nyata dengan perlakuan B sehingga diberi notasi ab. Selanjutnya dilakukan pengujian polinomial orthogonal yang dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh yang diberikan oleh bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) terhadap bakteri *V. parahaemolyticus*. Hasil pengujian polinomial orthogonal disajikan dengan grafik hubungan antara dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan BCR bakteri *V. parahaemolyticus* pada Gambar 12.



Gambar 12. Hubungan Dosis Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.) dengan BCR Bakteri *V. parahaemolyticus*

Berdasarkan grafik diatas diketahui bahwa hubungan antara konsentrasi dosis bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan BCR bakteri *V. parahaemolyticus* adalah linier. Sehingga dengan pemberian bubuk ekstrak tinta cumi- cumi (*Loligo* sp.) dengan dosis yang semakin tinggi dapat menghasilkan nilai BCR yang semakin meningkat. Grafik yang dihasilkan memiliki persamaan $y = -0,859 + 0,076x$ dengan nilai R^2 sebesar 0,8792. Menurut Ghozali (2006), koefisien

determinasi (R^2) digunakan untuk menentukan model regresi tersebut cukup baik digunakan atau tidak.

Tahapan pembentukan biofilm terdiri dari lima tahapan. Menurut Watnick dan Kolter (2000), pada tahap pertama sel planktonik bakteri akan berpindah dari cairan ke permukaan benda padat. Pada tahapan ini, proses perlekatan sel masih bersifat sementara, namun pada tahap kedua, sel bakteri telah menempel secara permanen akibat terbentuknya materi eksopolimer yang merupakan suatu senyawa perekat yang lebih kuat. Pada tahapan ketiga, ditandai dengan terbentuknya mikrokoloni dan biofilm yang mulai terbentuk. Bakteri mulai berkembang biak dan memancarkan sinyal kimiawi sebagai alat komunikasi antar sel bakteri. Pada tahapan keempat, biofilm yang terbentuk semakin banyak dan membentuk struktur tiga dimensi yang mengandung sel yang terselubung dalam beberapa kelompok yang saling terhubung satu sama lainnya. Pada tahapan terakhirnya, perkembangan dari struktur biofilm mengakibatkan terjadinya disperse sel sehingga sel tersebut berpindah dan membentuk biofilm yang baru. Pada biofilm yang sudah terbentuk, proses pembelahan sel jarang terjadi. Pada kondisi tersebut, sel biofilm menggunakan sebagian besar energi untuk membentuk ekdopolisakarida yang dibutuhkan sel sebagai nutrisi.

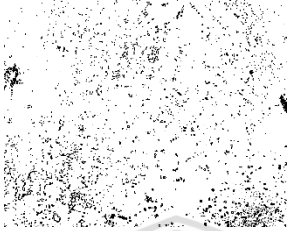
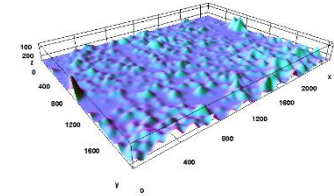
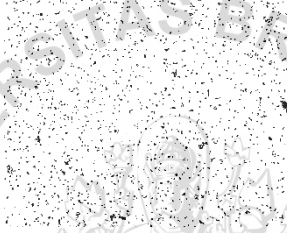
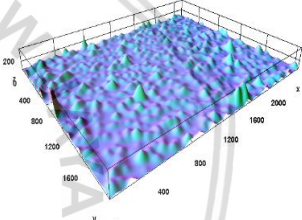
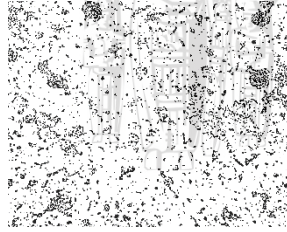
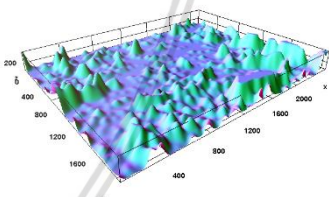
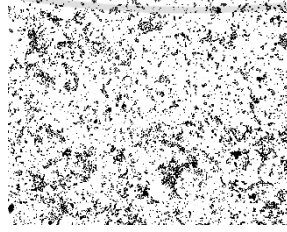
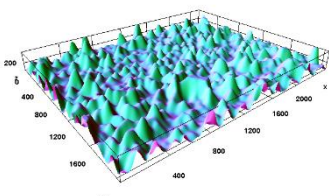
Hasil penelitian menunjukkan bahwa dengan pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) memiliki pengaruh dalam mencegah pembentukan biofilm yang dilihat dari nilai *Biofilm Coverage Rate* atau rasio tutupan biofilm bakteri *V. parahaemolyticus* yang memiliki nilai yang rendah pada dosis pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi sebesar 150 ppm. Hal tersebut dikarenakan bubuk ekstrak tinta cumi-cumi memiliki kandungan senyawa aktif.

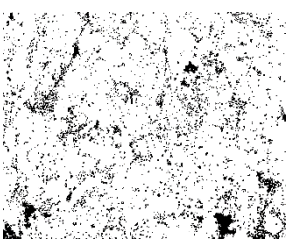
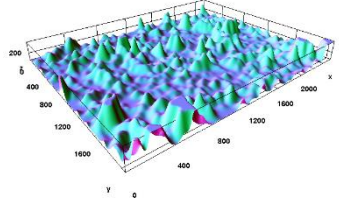
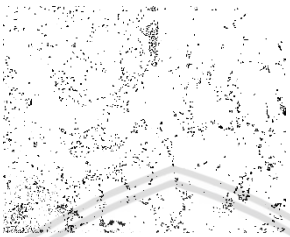
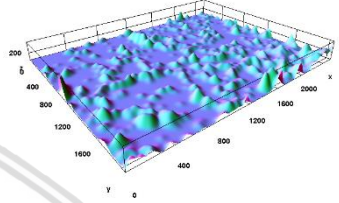
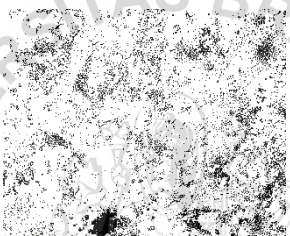
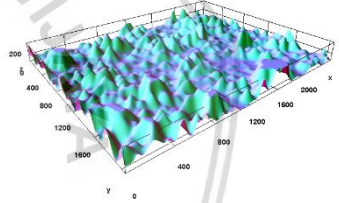
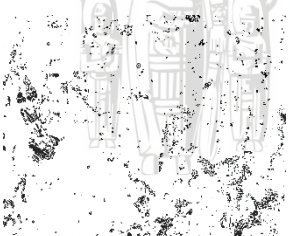
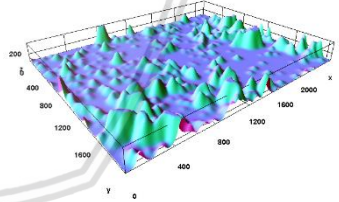
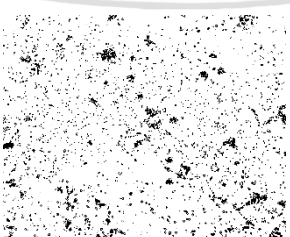
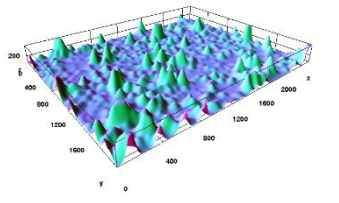
4.4 Visualisasi 3 Dimensi (3D)

Visualisasi 3 dimensi (3D) dilakukan setelah mengetahui nilai BCR. Hal ini dilakukan untuk mengetahui bentuk biofilm yang dihasilkan oleh bakteri *V.*

parahaemolyticus. Cara menampilkan visual 3D menggunakan software Image-J. Hasil dari visualisasi 3D disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Visualisasi BCR Bakteri *V. parahaemolyticus*

Perlakuan	Grayscale Image	Visualisasi 3D
A1		
A2		
A3		
B1		

B2		
B3		
C1		
C2		
C3		

Tabel 11 menunjukkan hasil visualisasi 3D biofilm bakteri bakteri *V. parahaemolyticus* menggunakan software Image-J. Berdasarkan Tabel 11 dapat diketahui bahwa semakin banyak bukit yang terbentuk pada gambar maka

menunjukkan nilai BCR semakin tinggi. Namun, apabila semakin sedikit bukit yang terbentuk maka semakin rendah nilai BCR pada suatu substrat. Bukit berwarna hijau menunjukkan besarnya tutupan biofilm pada suatu substrat. Dari gambar visualisasi 3D, diketahui bahwa hasil tutupan biofilm terluas secara berurutan bakteri *V. parahaemolyticus* yaitu pada perlakuan C (dosis ekstrak tinta cumi-cumi sebanyak 250 ppm) lalu pada perlakuan B (dosis ekstrak tinta cumi-cumi sebanyak 200 ppm) dan hasil pada perlakuan A (dosis ekstrak tinta cumi-cumi sebanyak 150 ppm).

Metode penghitungan dan penyajian biofilm dalam bentuk tiga dimensi (3D) menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM), *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) yang dilanjutkan dengan menganalisisnya dengan software berbayar yang merupakan cara umum untuk pengujian biofilm (Kamper, et al., 2004). Menurut Prihanto, et al. (2015), Image-J merupakan software pemrosesan gambar yang dapat diunduh secara gratis dari “*National Institute of Health*”, USA. Software ini dapat digunakan untuk menganalisis berbagai gambar yang berhubungan dengan gambar analisis di bidang biologi molekuler seperti *western blotting* dan *PCR band*.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang didapatkan dari penelitian ini adalah bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) berpengaruh terhadap daya hambat dan *Biofilm Coverage Rate* (BCR) bakteri *V. parahaemolyticus*. Berdasarkan hasil yang diperoleh, dengan pemberian dosis bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) yang semakin meningkat maka daya hambat yang dihasilkan semakin meningkat. Hasil daya hambat terbaik didapatkan pada perlakuan C dengan dosis 250 ppm dengan rata-rata daya hambat sebesar 10,29 mm. Pada pembentukan biofilm diketahui dosis terbaik yaitu pada perlakuan A dengan dosis 150 ppm dengan rata-rata nilai BCR sebesar 10,44%.

5.2 Saran

Saran yang diberikan untuk penelitian ini adalah perlunya pengujian lebih lanjut mengenai dosis optimal dari *Biofilm Coverage Rate* (BCR) sehingga dapat digunakan untuk mengetahui besaran tutupan Biofilm yang optimal serta pengujian lebih lanjut mengenai struktur biofilm yang terbentuk setelah pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.), sehingga dapat digunakan untuk mengetahui pengaruhnya hingga ke struktur biofilm yang terbentuk, tidak hanya berdasarkan luasan tutupan biofilm yang dihasilkan.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, Mugiono, T. Arlianti dan C. Azmi. 2011. Panduan Lengkap Jamur. Niaga Swadaya. Jakarta. 175 hlm.
- Budiarti, T., A. Mazuki dan N. B. P. Utomo. 2005. Produksi udang vaname (*Litopenaeus vaname*) di tambak biocrete dengan padat penebaran berbeda. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **4** (2): 109-113.
- Cabassi, E. and Mod, L., *Vibrio pmuhoemolyricus*: aetiological agent of food poisoning. *Folio. Vet. hi.*, 6. 335, 1976
- Charles-Hernández, G.L., E. Cifuentes, S.J. Rothenberg. 2006. Environmental factors associated with the presence of *Vibrio parahaemolyticus* in sea products and the risk of food poisoning in communities bordering the Gulf of Mexico. *Journal of Environmental Health Research*. **5**(2).
- Daniels, N. A., L. MacKinnon., R. Bishop., S. Altekruse., B. Ray., R. M. Hammond., S. Thompson., S. Wilson., N. H. Bean., P. M. Griffin and L. Slutsker. 2000. *Vibrio parahaemolyticus* infection in the United States. *The Journal of Infectious Diseases*. 181: 1661-1665
- Diaz, J. H. J. and R. D. Thilaga. 2016. Screening of antimicrobial activities in the ink of cephalopods against human pathogens. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. **5** (6): 2359-2367.
- Djide, M, N, dan Sartini. 2008. Dasar-Dasar Mikrobiologi Farmasi. Makassar: Lembaga Penerbit Unhas.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. **8**(9): 881-890.
- Donlan, R. M. and J. W. Costerton. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*. **15**(2): 167-193.
- Fadjar, M., S. Andajani and K. Zaelani. 2016. Squid (*Loligo edulis*) ink raw extract as an anti- vibriosis substance in grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) juvenile culture infected by *Vibrio alginolyticus*. *AACL Bioflux*, **9** (2): 424p.
- Garrett, T. R., M. Bhakoo and Z. Zhang. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*. **18**: 1049-1056.
- Girija, A. S. S., J. V. Priyadharsini., K. P. Suba., P. Hariprasad and R. Raguraman. 2012. Antibacterial effect of squid ink on ESBL producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*. **41**(4): 338-343.
- Hamdi, A. S. dan E. Bahrudin. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi Dalam Pendidikan. Deepublish. Yogyakarta. 171 hlm.
- Hanafiah, K. A. 2013. *Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi Edisi 3*. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 259 hlm.
- Homenta, H. 2016. Infeksi biofilm bakterial. *Jurnal e-Biomedik*. **4**(1): 1-11.

- Jamal, M., Tasneem¹, U., Hussain, T. and Saadia Andleeb S. 2015. Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human infections. Research & Reviews: *Journal of Microbiology and Biotechnology*. **4**(3).
- Joseph, R. W., R. R. Cowell and J. B. Kaper. 2013. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios. **10**(1): 79-80
- Kilawati, Y. dan Y. Maimunah. 2015. Kualitas lingkungan tambak intensif *Litopenaeus vannamei* dalam kaitannya dengan prevalensi penyakit white spot syndrome virus. *Research Journal of Life Science*. **2**(1): 50-59.
- Kimura, K., Tatciri, S., and Iida, H. 1979. Effects of pH of the medium on flagellation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 1248.
- Kenny J. G., Ward D., Josefsson E., Jonsson I. M., Hinds J., Rees H. H., Lindsay J. A., Tarkowski A and Horsburgh M. J., 2009 The *Staphylococcus aureus* response to unsaturated long chain free fatty acids: survival mechanisms and virulence implications. *PLoS ONE*, **4**:e4344p.
- McLaughlin, J.B., A. DePaola, C.A. Bopp, K.A. Martinek, N.P. Napolilli, C.G. Allison, S.L. Murray, E.C. Thompson, M.M. Bird, and J.P. Middaugh. 2005. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* Gastroenteritis Associated with Alaskan Oysters. *The New England Journal of Medicine* **353**;14
- Miller MB, Bassler BL. 2001. *Quorum sensing* in bacteria. *Annu Rev Microbiol*. **55**:165-199.
- Mohanraju, R., D. B. Marri, P. Karthick, S. Narayana, K. N. Nurthy and Ch. Ramesh. 2013. Antibacterial activity of certain cephalopods from Andamans, India. *International Journal of Pharmacy and Biological Science*. **3** (2): 450-455.
- Muliani., B. R. Tampangallo., M. Atmomarsono. 2016. Aktivitas antibakteri penyebab vibriosis terhadap udang windu dari ekstrak herbal mangrove *Sonneratia alba* dan *Bruguiera gymnorrhiza*. *Jurnal Riset Akuakultur*. **11**(3): 281-289.
- Nadel, C. D., J. B. Xavier, S. A. Levin and K. R. Foster. 2008. The evolution of *Quorum sensing* in bacterial biofilms. *PLoS Biology*. **6** (1): 171-179.
- Nagy, M.M. 2010. *Quorum sensing* inhibitory activities of various folk medicinal plants and the elucidation of the thyme tetracycline effect, *Disertasi*, George State University, Atlanta
- Nazir, M. 2005. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta. 543 hlm.
- Nirmale, V., B. B. Nayak., S. Kannappan and S. Basu. 2002. Antibacterial effect of the Indian Squid, *Loligo duvauceli* (d'Orbigny), Ink. *Journal of the Indian Fisheries Association*, **29**: 65-69.
- Nofiani, R., S. Nurbetty dan A. Sapar. 2009. Aktivitas antimikroba ekstrak metanol bakteri berasosiasi spons Dari Pulau Lemukutan, Kalimantan Barat. *E-Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*, **1**(2): 33-41.
- Nuria, M. C., A. Faizatun dan Sumantri. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro*. **5**(2): 26-37.

- Purbowati, R. 2016. Hubungan Biofilm Dengan Infeksi: Implikasi Pada Kesehatan Masyarakat Dan Strategi Mengontrolnya. *Jurnal Ilmiah Kedokteran*. 5(1):2hlm.
- Sakauki, R., Iwarumi, S., and Fukumi, H., Studies on the enteropathogenic. Facultatively halophilic bacteria. *Vibrio parahaemolyticus*. morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position, *Jup. Med. Sci. Biol.* 16, 161, 1963
- Tolker-Nielsen T, Molin S. 2000. Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol.* 40: 75-84.
- Vasudevan, R. 2014. Biofilm: microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*. 1(3): 1-16.
- Wiyoto dan J. Ekasari. 2010. Kuorum sensing bakteri dan peran alga dalam pengendalian penyakit bakterial dalam akuakultur. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. 9 (2): 110-118.
- Yennie, Y., R. D. Hariyadi dan A. Poernomo. 2015. Prevalence of tdh and trh genes of *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp (*L. vannamei*) from Indramayu, West Java. *JPB Kelautan dan Perikanan*. 10(1): 61-70



LAMPIRAN

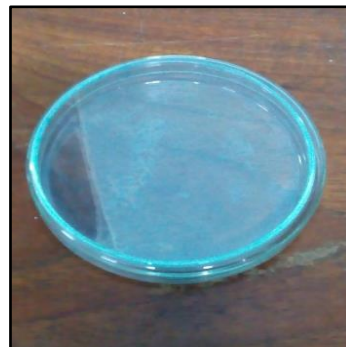
Lampiran 1. Peralatan Penelitian



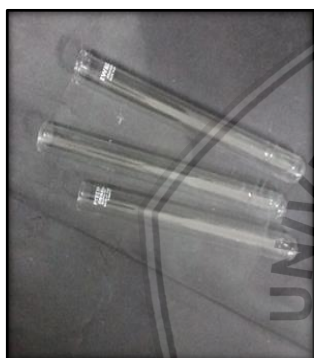
Autoklaf



Lemari Pendingin



Cawan Petri



Tabung Reaksi



Mikropipet



Hot Plate



Vortex Mixer



Timbangan Digital



Erlenmeyer



Nampan



Washing Bottle



Bunsen

Lampiran 1. (Lanjutan)



Oven



Rak Tabung Reaksi



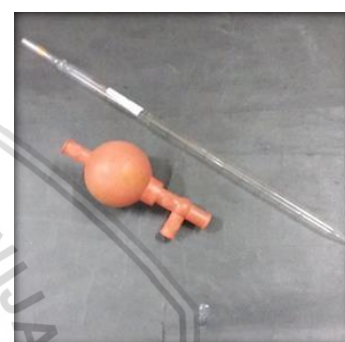
Mikroskop Elektron



Sendok Media



Pinset



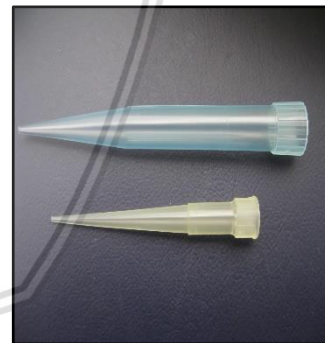
Pipet Volume, Bola Hisab



Jarum Ose



Spatula



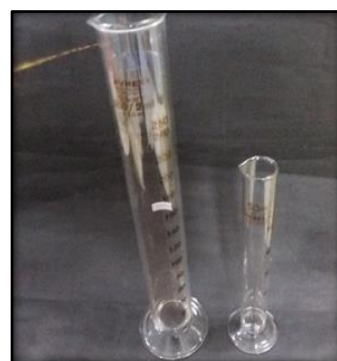
Blue dan Yellow Tip



Microtitter Plate 6 Lubang



Spektrofotometer



Gelas Ukur

Lampiran 1. (Lanjutan)



Timbangan Analitik



Inkubator



Laminary Air Flow



Sprayer



Lampiran 2. Bahan Penelitian



Metanol



Kapas



Bakteri *V. harveyi*



Akuades



Alkohol 70%



Tisu



Alumunium Foil



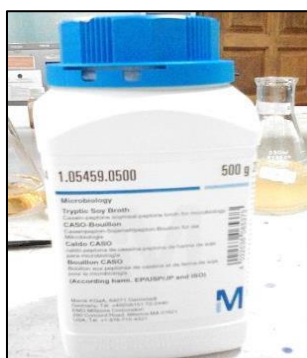
Kertas Label



Karet Gelang



Spirtus



Media



Masker

Lampiran 2. (Lanjutan)



Sarung Tangan



Cover Glass



Plastik Wrap



Crystal Violet



NaCl



Etanol 95%



Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.)

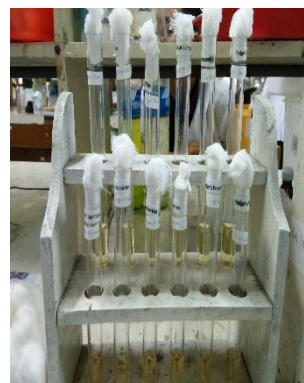
Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan



Penimbangan Media untuk MIC



Media MIC sebelum sterilisasi



Media persiapan MIC



Uji MIC dengan Spektrofotometer



Penanaman bakteri dan ekstrak untuk uji MIC



Hasil peremajaan bakteri



Perendaman kertas cakram pada perlakuan



Media TCBS uji cakram



Penanaman bakteri biofilm



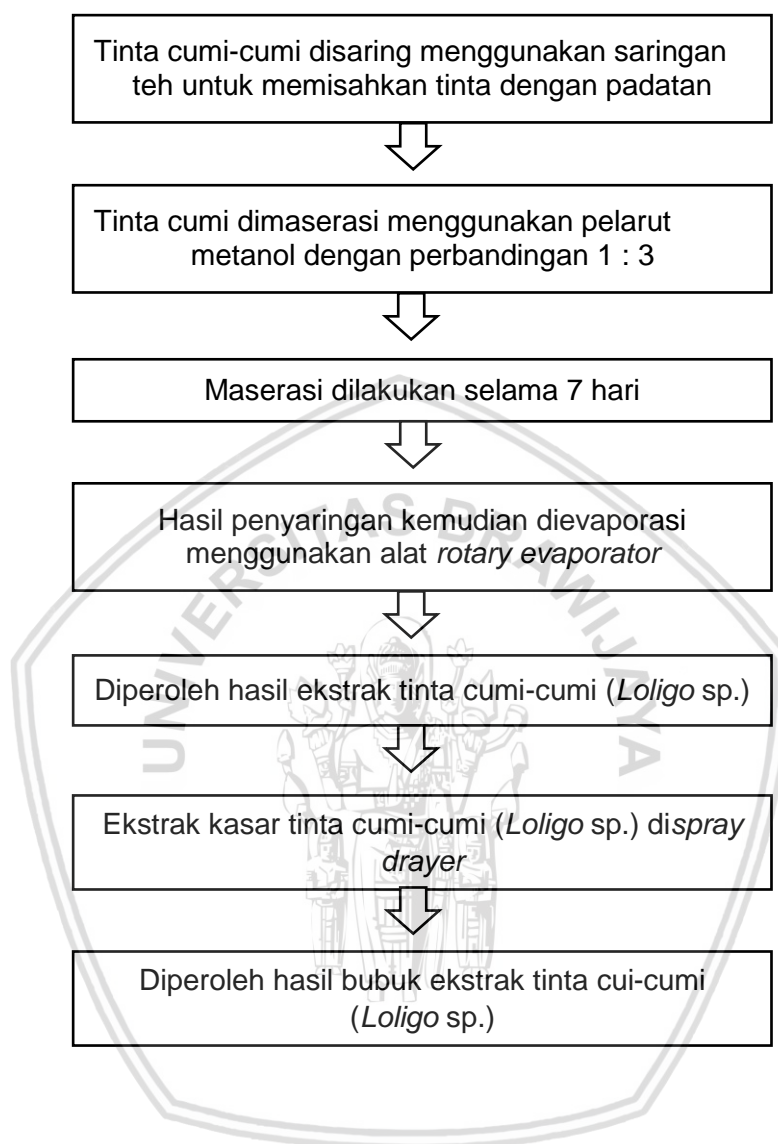
Uji biofilm *V. harveyi*



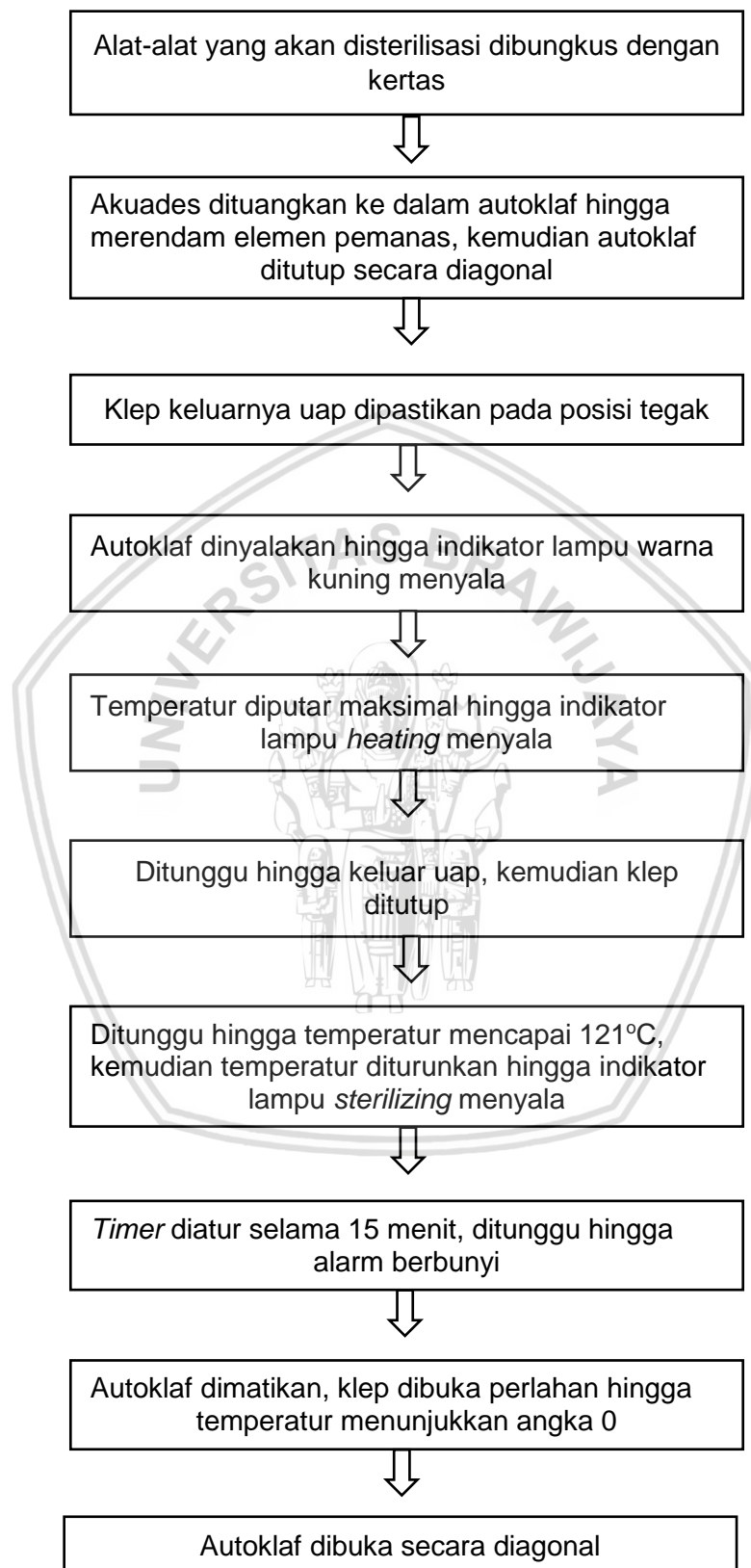
Pengangkatan biofilm



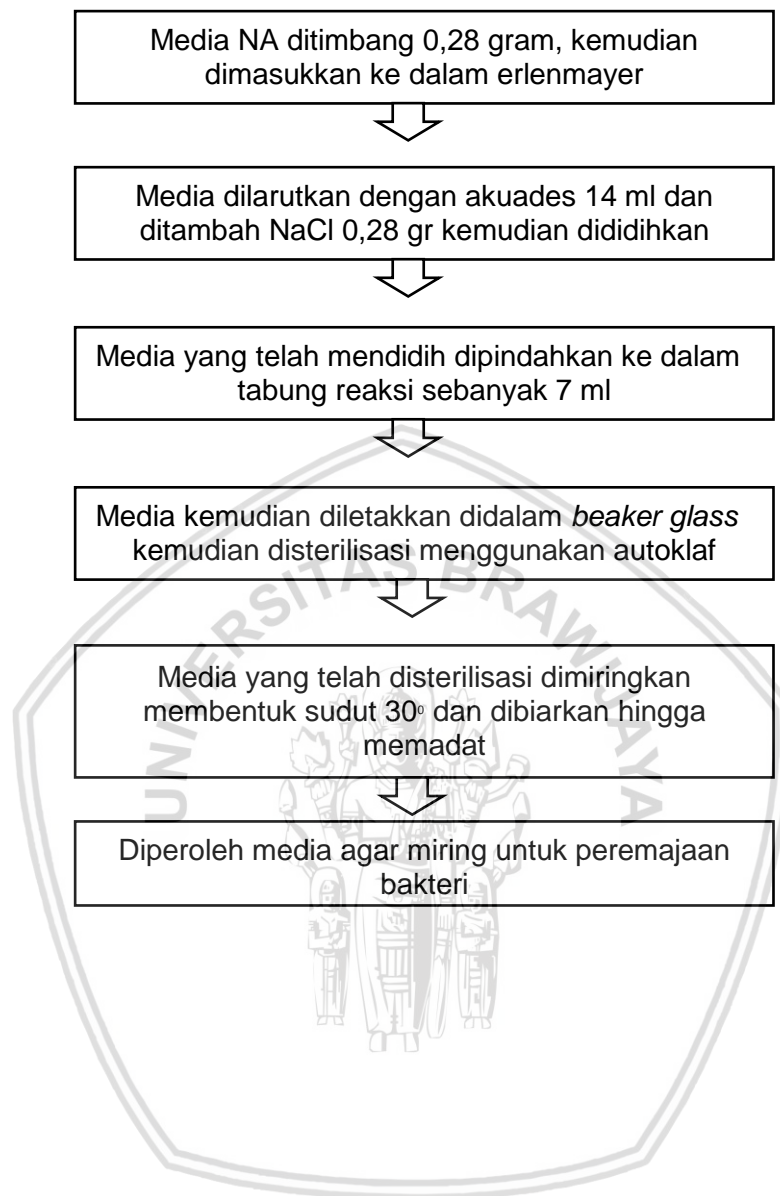
Hasil pewarnaan biofilm

Lampiran 4. Skema Kerja**a. Bubuk Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.)**

b. Sterilisasi



c. Pembuatan Media NA



d. Pembuatan Media TSB

Media TSB ditimbang 0,54 gram ditambah dengan NaCl 0,27 gram, kemudian dimasukkan ke dalam



Media dilarutkan dengan akuades 18 ml kemudian dihomogenkan



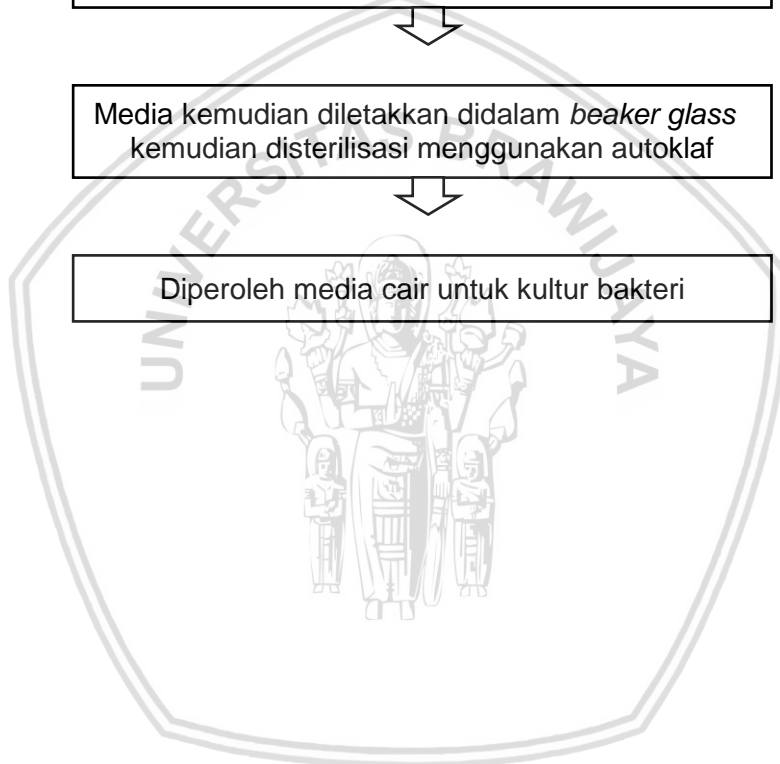
Media dipindahkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml



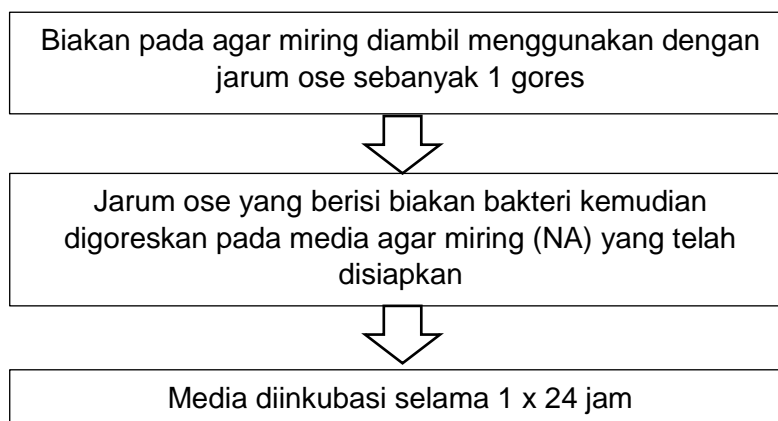
Media kemudian diletakkan didalam *beaker glass* kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf



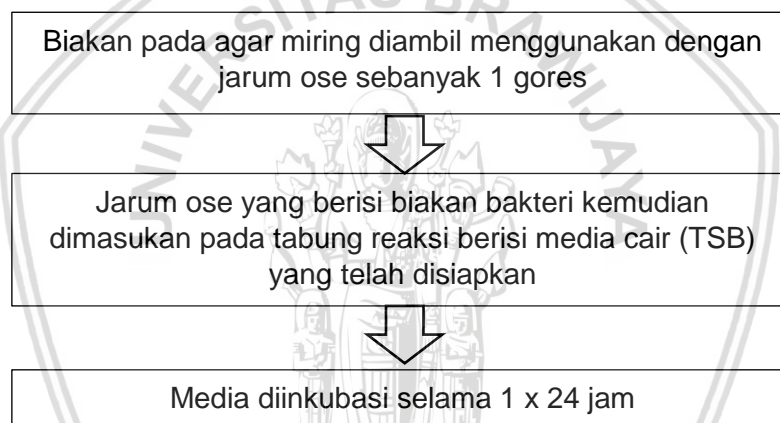
Diperoleh media cair untuk kultur bakteri



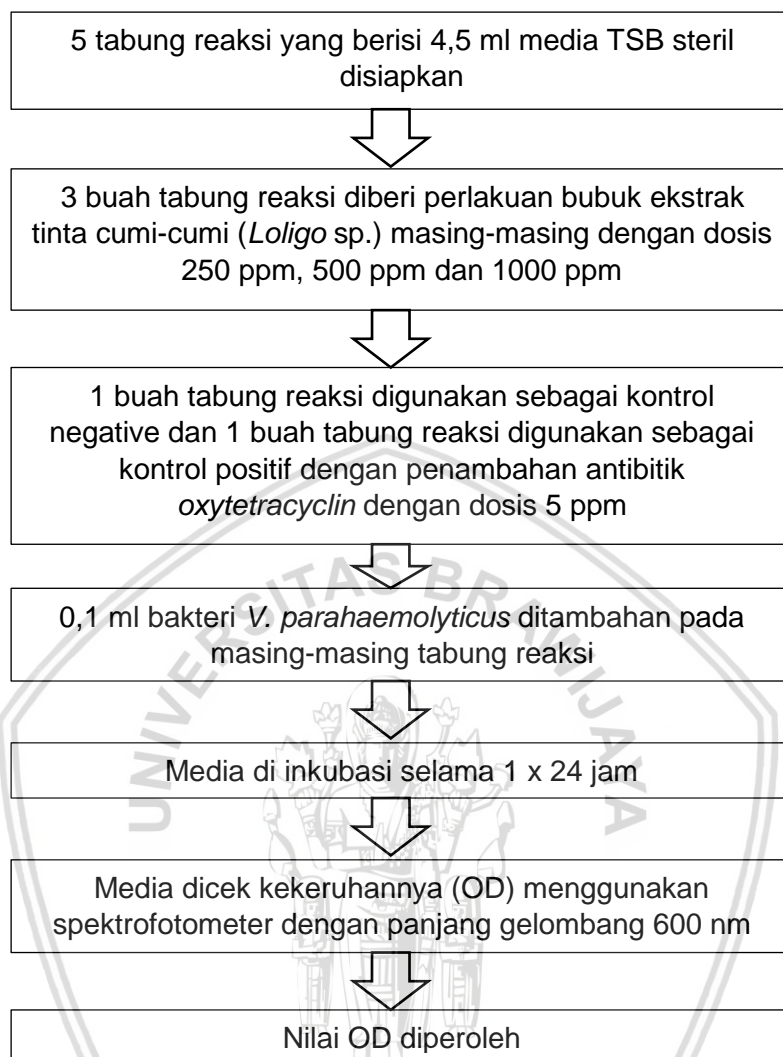
e. Peremajaan Bakteri pada Media Padat



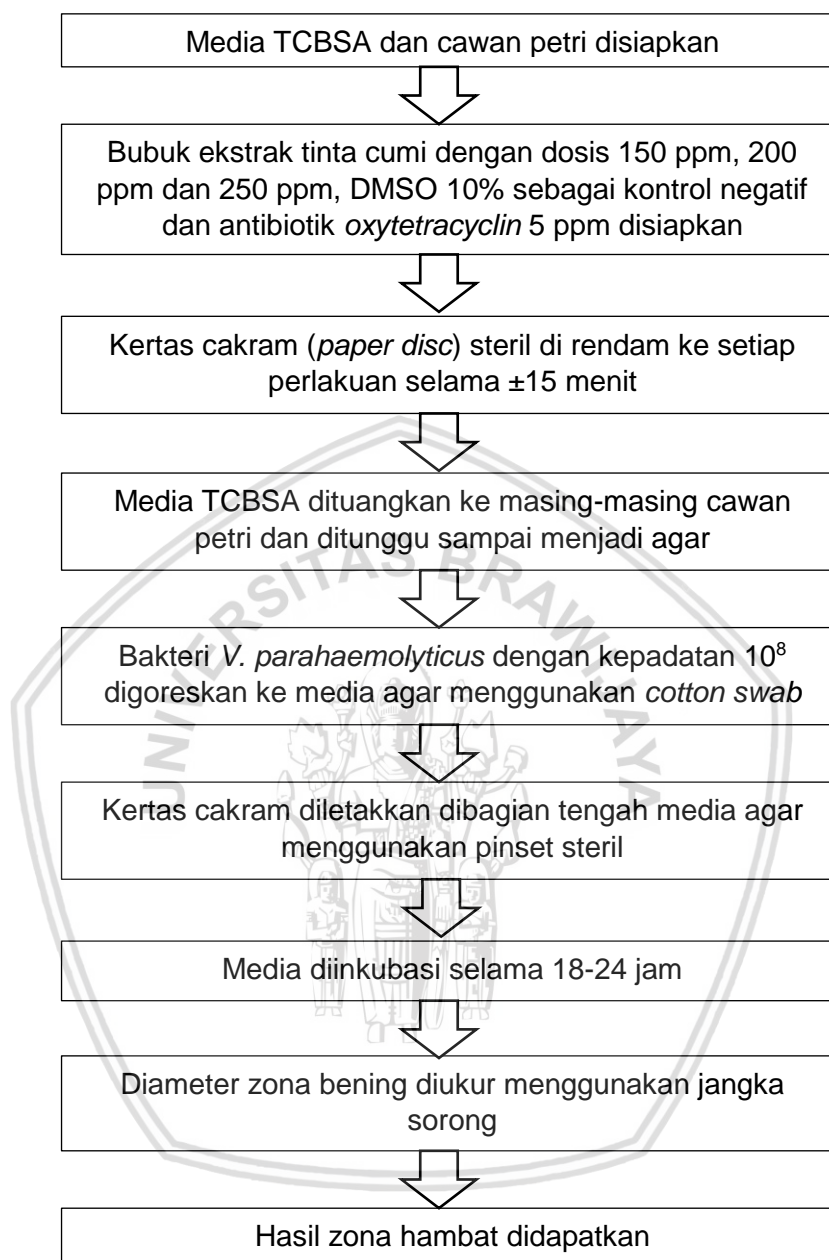
f. Kultur pada Media Cair



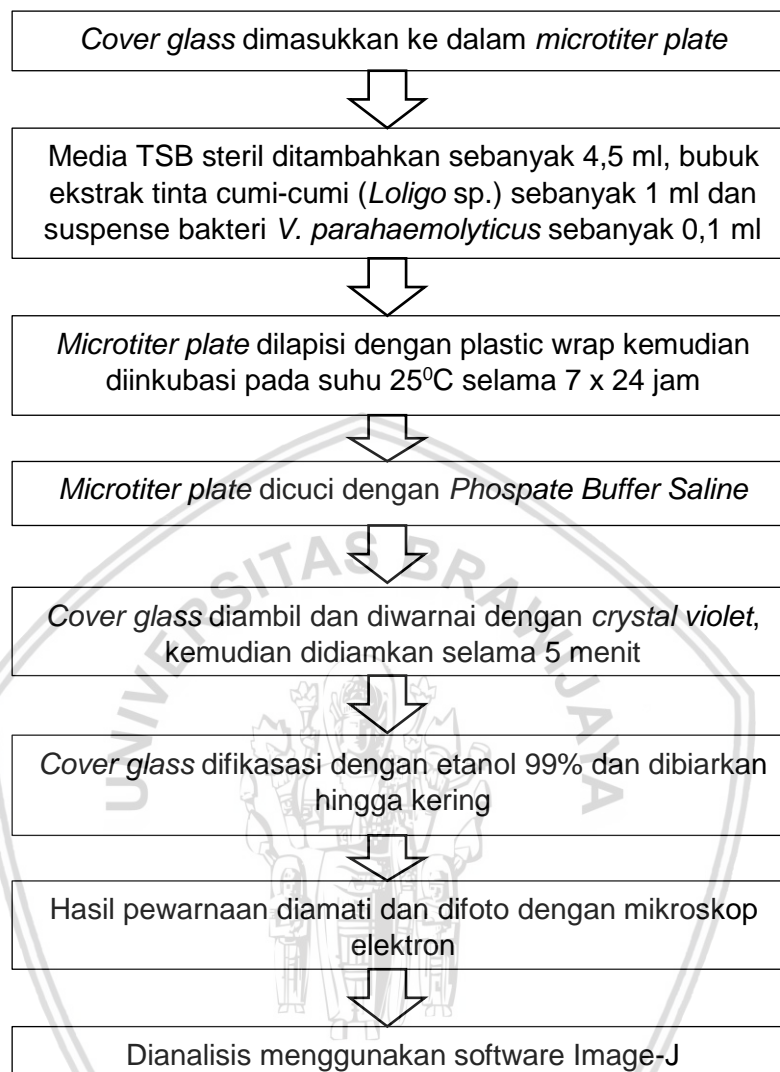
g. Uji *Minimum Inhibiting Concentration* (MIC)



h. Uji Daya Hambat



i. Uji Pembentukan dan Pertumbuhan Biofilm



Lampiran 5. Perhitungan Pembuatan Media

a. Pembuatan Media TSB

Pada kemasan media TSB terdapat petunjuk penggunaan media, dijelaskan bahwa dosis yang digunakan yaitu 30 gram per 1 liter. Dikarenakan *V. parahaemolyticus* bakteri air laut sehingga perlu ditambahkan 3 jenis garam yaitu KCl, NaCl dan MgSO₄ sebagai media hidup bakteri. Media yang dibutuhkan yaitu 27 ml dan perhitungan media TSB yang dibutuhkan adalah sebagai berikut ini:

$$\begin{aligned}\text{TSB} &= \frac{30 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)} \\ &= \frac{30}{1000} \times 27 \text{ ml} \\ &= 0,81 \text{ gram}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{NaCl} &= \frac{18,4 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)} \\ &= \frac{18,4 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 27 \text{ ml} \\ &= 0,4968 \text{ gram}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{KCl} &= \frac{0,75 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)} \\ &= \frac{0,75 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 27 \text{ ml} \\ &= 0,02 \text{ gram}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{MgSO}_4 &= \frac{6,94 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)} \\ &= \frac{6,94 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 27 \text{ ml} \\ &= 0,187 \text{ gram}\end{aligned}$$

b. Pembuatan Media NA

Pada kemasan media NA terdapat petunjuk penggunaan media, dijelaskan bahwa dosis yang digunakan yaitu 20 gram per 1 liter. Dikarenakan *V. parahaemolyticus* bakteri air laut sehingga perlu ditambahkan 3 jenis garam yaitu KCl, NaCl dan MgSO₄ sebagai media hidup bakteri. Media yang dibutuhkan yaitu 100 ml dan perhitungan media TCBSA yang dibutuhkan adalah sebagai berikut ini:

$$\text{TCBSA} = \frac{20 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)}$$

$$= \frac{20}{1000} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 2 \text{ gram}$$

$$\text{NaCl} = \frac{18,4 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)}$$

$$= \frac{18,4 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 1,84 \text{ gram}$$

$$\text{KCl} = \frac{0,75 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)}$$

$$= \frac{0,75 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 0,075 \text{ gram}$$

$$\text{MgSO}_4 = \frac{6,94 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)}$$

$$= \frac{6,94 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 0,694 \text{ gram}$$

c. Pembuatan Media TCBSA

Pada kemasan media TCBSA terdapat petunjuk penggunaan media, dijelaskan bahwa dosis yang digunakan yaitu 88 gram per 1 liter. Dikarenakan *V. parahaemolyticus* bakteri air laut sehingga perlu ditambahkan 3 jenis garam yaitu KCl, NaCl dan MgSO₄ sebagai media hidup bakteri. Media yang dibutuhkan yaitu 100 ml dan perhitungan media NA yang dibutuhkan adalah sebagai berikut ini:

$$\text{TCBSA} = \frac{88 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)}$$

$$= \frac{88}{1000} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 8,8 \text{ gram}$$

$$\text{NaCl} = \frac{18,4 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)}$$

$$= \frac{18,4 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 1,84 \text{ gram}$$

$$\text{KCl} = \frac{0,75 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)}$$

$$= \frac{0,75 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 0,075 \text{ gram}$$

$$\text{MgSO}_4 = \frac{6,94 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times \text{Volume media yang dibutuhkan (ml)}$$

$$= \frac{6,94 \text{ gram}}{1000 \text{ ml}} \times 100 \text{ ml}$$

$$= 0,694 \text{ gram}$$

Lampiran 6. Analisis Data Uji Daya Hambat

a. Data Uji Daya Hambat

Perlakuan	Ulangan			Total (mm)	Rata-Rata (mm)
	1	2	3		
A	8.81	8,98	8.93	26.72	8.91±0,99
B	9.77	9.60	9.91	29.28	89.76±0,16
C	10.26	10.69	9,92	30.87	10.29±0,39
Total				86.87	

Perhitungan

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{(\sum Y)^2}{n \times r}$$

$$= \frac{(86.87)^2}{3 \times 3}$$

$$= 838.49$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} = \sum Y_{ij}^2 - \text{FK}$$

$$= (A_1)^2 + (A_2)^2 + (A_3)^2 + \dots + (C_3)^2 - \text{FK}$$

$$= (77.62)^2 + (80.64)^2 + (79.74)^2 + \dots$$

$$(98.41)^2 - 838.49$$

$$= 3.28$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} = \frac{\sum Y_i^2}{r} - \text{FK}$$

$$= \frac{(26.72)^2 + (29.28)^2 + (30.87)^2}{3} - 838.49$$

$$= \frac{25.2423}{3} - 838.49$$

$$= 2.92$$

$$\text{Jumlah Kuadrat Acak (JKA)} = \text{JKT} - \text{JKP}$$

$$= 3.28 - 2.92$$

$$= 0.36$$

$$\text{Derajat Bebas Total (db total)} = (n \times r) - 1$$

$$= (3 \times 3) - 1$$

$$= 8$$

$$\begin{aligned}\text{Derajat Bebas Perlakuan} &= n - 1 \\ (\text{db perlakuan}) &= 3 - 1 \\ &= 2 \\ \text{Derajat Bebas Acak (db Acak)} &= n \times (r - 1) \\ &= 3 \times (3 - 1) \\ &= 6 \\ \text{Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)} &= \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db perlakuan}}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}&= \frac{2.92}{2} \\ &= 1.46 \\ \text{Kuadrat Tengah Acak (KTA)} &= \frac{\text{JK Acak}}{\text{db acak}}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}&= \frac{0.36}{6} \\ &= 0.06 \\ \text{F Hitung} &= \frac{\text{KT Perlakuan}}{\text{KT Acak}} \\ &= \frac{1.46}{0.06} \\ &= 24.27\end{aligned}$$

b. Analisis Sidik Ragam Uji Daya Hambat

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	2	2.92	1.46	24.27**	5.14	10.92
Acak	6	0.36	0.06			
Total	8	3.28				

Keterangan:

** = berbeda sangat nyata

Hasil analisis sidik ragam seperti tabel diatas menunjukkan bahwa nilai dari F Hitung sebesar 24.27 lebih besar jika dibandingkan dengan nilai F Tabel 5% dan F Tabel 1%. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *V. parahaemolyticus*. Sehingga untuk

mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

$$\text{SED} = \sqrt{\frac{2 \times \text{KT Acak}}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{2 \times 0,06}{3}}$$

$$= 0,20$$

$$\text{BNT 5\%} = t \text{ tabel 5\% (db acak)} \times \text{SED}$$

$$= 2,44 \times 0,20$$

$$= 0,490$$

$$\text{BNT 1\%} = t \text{ tabel 1\% (db acak)} \times \text{SED}$$

$$= 3,70 \times 0,20$$

$$= 0,743$$

c. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil

Perlakuan	A (8,91)	B(9,76)	C(10,29)	Notasi
A(8,91)	-			a
B(9,76)	0,85**	-		a
C(10,29)	1,38**	0,53 ^{ns}	-	ab

Keterangan:

ns = tidak berbeda nyata,

* = berbeda nyata,

** = berbeda sangat nyata

Perhitungan Uji *Polinomial Orthogonal*

Perlakuan	Total(Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadrat
A	26,72	-1	1
B	29,28	0	-2
C	30,87	1	1
Total	86,87		
Q= $\Sigma(Ci*Ti)$		4,15	0,03
ΣCi^2		2	6
$K\mu = (\Sigma Ci^2)*\mu$		6	18
$JK = Q^2/K\mu$		2,87	0,00
Total JK Regresi		2,87	

Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	2,87			6,61	13,75
Linier	1	2,87	2,87	47,67**		
Kuadrat	1	0,00	0,00	0,00 ^{ns}		
Acak	6	0,36	0,06			
Total	8	3,28				

Keterangan:

ns = tidak berbeda nyata,

* = berbeda nyata,

** = berbeda sangat nyata

R^2 Linier

$$= \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}}$$

$$= \frac{2,87}{2,87 + 0,36}$$

$$= 0,8882$$

R^2 Kuadrat

$$= \frac{JK \text{ Kuadrat}}{JK \text{ Kuadrat} + JK \text{ Acak}}$$

$$= \frac{0,00}{0,00 + 360}$$

$$= 0,0001$$

Perlakuan	X	Y	XY	X ²
A	150	8,81	1321,5	22500
A	150	8,98	1347	22500
A	150	8,93	1339,5	22500
B	200	9,77	1954	40000
B	200	9,60	1920	40000

Perlakuan	X	Y	XY	X ²
B	200	9,91	1982	40000
C	250	10,26	2565	62500
C	250	10,69	2672,5	62500
C	250	9,91	2480	62500
Jumlah	1800	86,87	17581,50	375000
Rerata	150	9,65		

Mencari b_1 dan b_0

$$\begin{aligned}
 b_1 &= \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \\
 &= \frac{17581,50 - \frac{1800 \times 86,87}{9}}{375000 - \frac{(1800)^2}{9}} \\
 &= 0,014 \\
 b_0 &= \bar{y} - b_1 \cdot \bar{x} \\
 &= 9,65 - 0,014 \times 200 \\
 &= 6,886
 \end{aligned}$$

Persamaan regresi linier adalah $y = b_0 + b_1x$ sehingga didapatkan persamaan

$$Y = 6,886 + 0,014x$$

Lampiran 7. Analisis Data *Biofilm Coverage Rate*

a. Data *Biofilm Coverage Rate*

Perlakuan (ppm)	Ulangan			Total (%)	Rerata (%)
	1	2	3		
A	10,84	9,26	11,21	31,31	10,44
B	16,39	12,82	14,59	43,80	16,60
C	19,47	16,90	17,77	54,14	18,05
Total				129,25	

Perhitungan

$$\begin{aligned}
 \text{Faktor Koreksi} &= \frac{(\sum Y)^2}{n \times r} \\
 &= \frac{(129,25)^2}{3 \times 3} \\
 &= 1856,17 \\
 \text{Jumlah Kuadrat Total (JKT)} &= \sum Y_{ij}^2 - FK \\
 &= (A_1)^2 + (A_2)^2 + (A_3)^2 + \dots + (C_3)^2 - FK \\
 &= (10,84)^2 + (9,26)^2 + (11,21)^2 + \dots + (17,77)^2 - 1856,17 \\
 &= 99,06 \\
 \text{Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP)} &= \frac{\sum Y_i^2}{r} - FK \\
 &= \frac{(31,31)^2 + (43,60)^2 + (54,14)^2}{3} - 1856,17 \\
 &= 87,12 \\
 \text{Jumlah Kuadrat Acak (JKA)} &= JKT - JKP \\
 &= 99,06 - 87,12 \\
 &= 11,94 \\
 \text{Derajat Bebas Total (db total)} &= (n \times r) - 1 \\
 &= (3 \times 3) - 1 \\
 &= 8 \\
 \text{Derajat Bebas Perlakuan} &= n - 1 \\
 \text{(db perlakuan)} &= 3 - 1
 \end{aligned}$$

$$= 2$$

$$\text{Derajat Bebas Acak (db Acak)} = n \times (r - 1)$$

$$= 3 \times (3 - 1)$$

$$= 6$$

$$\text{Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)} = \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db perlakuan}}$$

$$= \frac{87,12}{1}$$

$$= 43,56$$

$$\text{Kuadrat Tengah Acak (KTA)} = \frac{\text{JK Acak}}{\text{db acak}}$$

$$= \frac{11,94}{6}$$

$$= 1,99$$

$$\text{F Hitung} = \frac{\text{KT Perlakuan}}{\text{KT Acak}}$$

$$= \frac{43,56}{1,99}$$

$$= 21,90$$

b. Analisis Sidik Ragam Uji Daya Hambat

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	2	87,12	43,56	21,90**	5,14	10,92
Acak	6	11,94	1,99			
Total	8	99,09				

Keterangan:

** = berbeda sangat nyata

Hasil analisis sidik ragam seperti tabel diatas menunjukkan bahwa nilai dari F Hltung sebesar 21,90 lebih besar jika dibandingkan dengan nilai F Tabel 5% dan F Tabel 1%. Hal tersebut menunjukkan bahwa dengan pemberian bubuk ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan biofilm bakteri *V. parahaemolyticus*. Sehingga untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{\frac{2 \times \text{KT Acak}}{r}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 1,99}{3}} \\ &= 1,151575 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t \text{ tabel 5\% (db acak) } \times \text{SED} \\ &= 2,44 \times 1,151575 \\ &= 2,818 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= t \text{ tabel 1\% (db acak) } \times \text{SED} \\ &= 3,70743 \times 1,151575 \\ &= 4,269 \end{aligned}$$

c. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil

Perlakuan	A (10,44)	B (14,60)	C (18,05)	Notasi
A (10,44)	-			a
B (14,60)	4,16*	-		b
C (18,05)	7,61**	3,45*	-	c

Keterangan:

* = berbeda nyata,

** = berbeda sangat nyata

Perhitungan Uji *Polinomial Orthogonal*

Perlakuan	Total(Ti)	Perbandingan (Ci)	
		Linier	Kuadratik
A	31,31	-1	1
B	43,80	0	-2
C	54,14	1	1
Total	129,25		
Q= $\Sigma(Ci \cdot Ti)$		22,83	-2,15
ΣCi^2		2	6
$K\mu = (\Sigma Ci^2) \cdot \mu$		6	18
$JK = Q^2 / K\mu$		86,87	0,26
Total JK Regresi		87,12	

Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	2	87,12			5,14	10,92
Linier	1	86,87	86,87	43,67**		
Kuadratik	1	0,26	0,26	0,13 ^{ns}		
Acak	6	11,94	1,99			
Total	8	99,06				

Keterangan:

ns = tidak berbeda nyata,

* = berbeda nyata,

** = berbeda sangat nyata

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{86,87}{86,87 + 11,94} \\
 &= 0,8792
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,26}{0,26 + 11,94} \\
 &= 0,0211
 \end{aligned}$$

Perlakuan	X	Y	XY	X ²
A	150	10,84	1626	22500
A	150	9,26	1389	22500
A	150	11,21	1681,5	22500
B	200	16,39	3278	40000
B	200	12,82	2564	40000
B	200	14,59	2918	40000
C	250	19,47	4867,5	62500
C	250	16,90	4225	62500
C	250	17,77	4442,5	62500
Jumlah	1800	129,25	26991,50	375000
Rerata	200	14,36		

Mencari b₁ dan b₀

$$b_1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \cdot \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

b_0

$$= \frac{26991,50 - \frac{1800 \times 129,25}{9}}{375000 - \frac{(1800)^2}{9}}$$

$$= 0,076$$

$$= \bar{y} - b_1 \cdot \bar{x}$$

$$= 14,36 - 0,076 \times 200$$


$$= -0,0859$$

Persamaan regresi linier adalah $y = b_0 + b_1x$ sehingga didapatkan persamaan

$$y = -0,859 + 0,076x$$




Lampiran 8. Hasil Uji Biokimia Bakteri *V. parahaemolyticus*



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU
LABORATORIUM UJI BBPBAP JEPARA

Alamat surat: PO Box 1 Jepara , Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418
Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
www.bbpbapjepara.djpb.kkp.go.id ; Email : bbpbapjpr@gmail.com



HASIL UJI BIOKIMIA

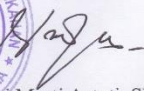
Hal : Uji biokimia Identifikasi Bakteri
Asal : Lab. Mikrobiologi
Alamat : BBAPAP Jepara
Jenis contoh : Isolat bakteri
Metode : Borrow. G.I and R.K.A. Feltham, 2003. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. First paperback edition. Cambridge University Press

Hasil

<u>Uji Bio Kimia</u>	<u>Isolat</u> <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
Bentuk	batang
Gram	—
Swarming	—
Growth with 0% NaCl	—
Arginine decarboxilase	—
Lysine decarboxilase	+
Ornithine decarboxilase	+
Nitrat reduced	+
Oxidase	+
Gas from Glucose	—
Indol	+
ONPG	—
VP	—
Resisten to :	
0/129 10 µg	+
0/129 150 µg	+
ampicillin 10 µg	+
Starch Hydrolysis	+
Urea Hydrolysis	+
Acid from :	
L-arabinose	—
Arbutin	—
Salicin	—
Sucrose	—
Xylose	—
Growth on :	
Ethanol	—
Propanol	—

Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara

Penyelia



Sri Murti Astuti, SP

